



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Análogos de somatostatina y cortistatina. Efecto de las interacciones aromáticas en sus estructuras y en la actividad biológica

Álvaro Rol Rúa

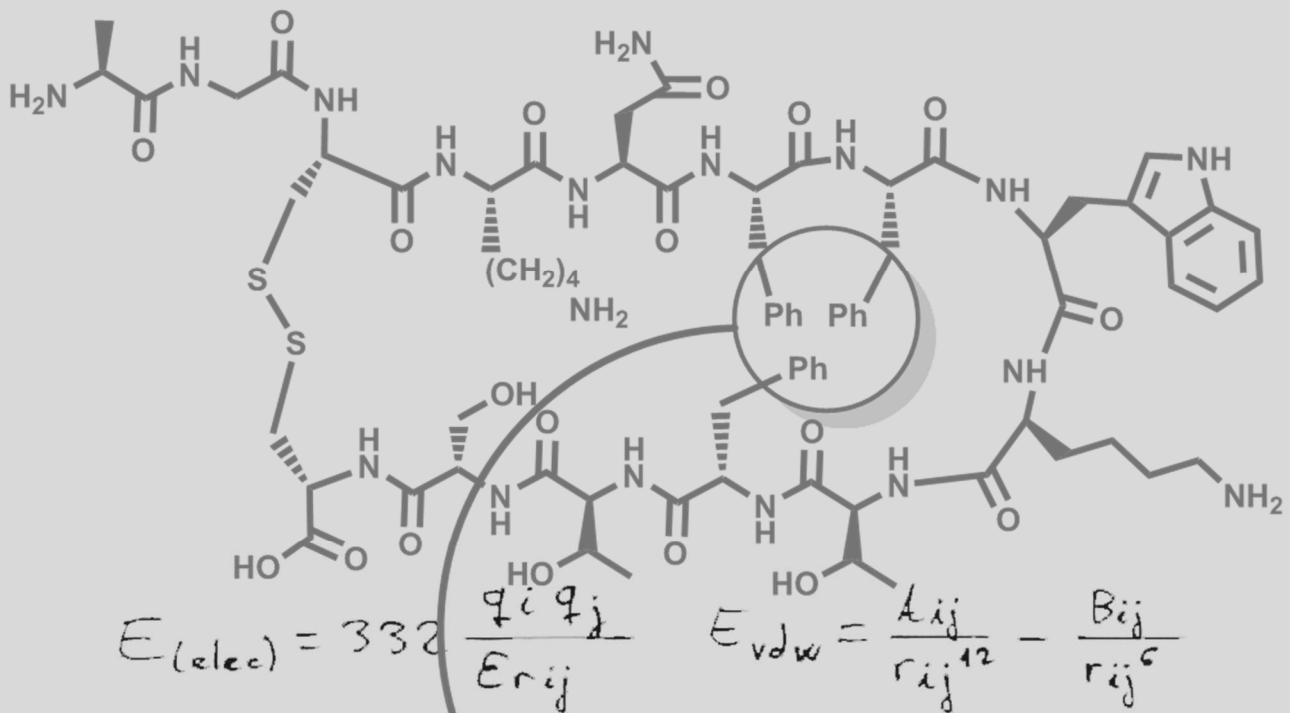
ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

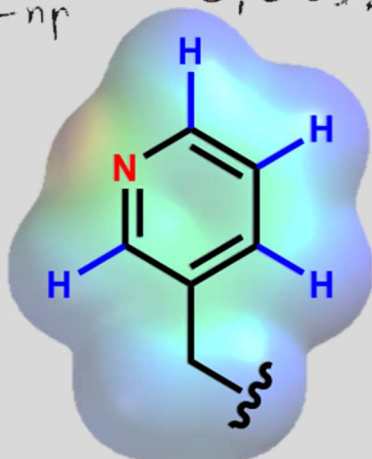
WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Análogos de somatostatina y cortistatina

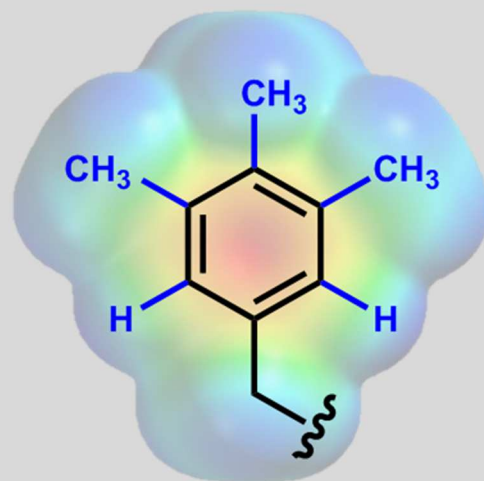
Efecto de las interacciones aromáticas en sus estructuras y en la actividad biológica



$$E_{np} \sim -0,025 \Delta SA$$



$\downarrow \rho(r)$



$\uparrow \rho(r)$



UNIVERSITAT DE BARCELONA



Álvaro Rol Rúa

Programa de doctorado de Química Orgánica

Análogos de somatostatina y cortistatina.

**Efecto de las interacciones aromáticas en sus estructuras y
en la actividad biológica.**

Álvaro Rol Rúa

Programa de doctorado de Química Orgánica

Departamento de Química Orgánica

Universitat de Barcelona

Director de tesis:

Dr. Antoni Riera Escalé

Dpto. de Química Orgánica, UB

IRB Barcelona

Codirectora de tesis:

Dra. María J. Macías Hernández

ICREA

IRB Barcelona



UNIVERSITAT DE BARCELONA



INSTITUTE
FOR RESEARCH
IN BIOMEDICINE

Memoria presentada por Álvaro Rol Rúa para optar al grado de DOCTOR en Ciencias Químicas por la Universitat de Barcelona.

Álvaro Rol Rúa

Revisada por:

Dr. Antoni Riera Escalé

Dra. María Jesús Macías Hernández

Barcelona, septiembre de 2015

Este trabajo se ha realizado gracias a una beca concedida por la Agencia de Gestión de Ayudas Universitarias y de Investigación (AGAUR), con una beca predoctoral del programa de Formación de Personal Investigador (FI), y del IRB Barcelona, con una beca predoctoral durante el curso 2012-2013. El trabajo ha sido financiado por los proyectos de investigación del Ministerio de Economía y Competitividad (CTQ2011-23620), el Gobierno de Cataluña (2009SGR-00901) y el soporte económico del IRB Barcelona.

El trabajo experimental se ha desarrollado en el laboratorio de la Unidad de Investigación en Síntesis Asimétrica (URSA), perteneciente al Instituto de Investigación Biomédica de Barcelona (IRB Barcelona), ubicada en el Parque Científico de Barcelona (PCB).

Agradecimientos

Presentar una tesis doctoral es el final de un largo camino, un camino que empieza mucho antes de hacer la primera reacción química, de pésimo resultado, con la que inauguras los estudios de doctorado. Es un trayecto que afortunadamente no se hace solo, y está plagado de gente a la que estar agradecido:

Al Dr. Antoni Riera por brindarme la oportunidad de trabajar en el equipo URSA. A pesar de nuestra antagónica visión en temas trascendentales tales como los tatuajes o las motos, la ópera nos sirvió como punto de encuentro. También a la Dra. María Macías por todo el apoyo y consejos dados, por su punto de vista wagneriano y, sobre todo, por dejarme invadir su laboratorio y aceptándome como uno más. Y al Dr. Xavier Verdaguer por sus conocimientos en MaxPHOS y reducciones, y su carne de Vic para barbacoas.

A los miembros de mi comisión de seguimiento: al Dr. Fernando Albericio, al Dr. Xavier Salvatella, al Dr. Francesc Rabanal y, especialmente, a la Dra. Miriam Royo, que gracias a nuestras batallas dialécticas ha conseguido implicarme más en la mejora de mi léxico y en dar esa dosis de esfuerzo extra tan necesaria en una tesis doctoral.

Al equipo somatostatina: a Pablo Antonio, cuya tesis será renombrada a *Introducción y previos a la tesis en somatostatina y cortistatina de Álvaro Rol*, a Toni Todorovski, вистински експерт за масена спектрометрија, y a Anna, cuyo apoyo logístico e informático ha sido indispensable para esta tesis. Muchas gracias a los tres.

Al resto del laboratorio, tanto antiguos como nuevos: a Daniel Lee, por esas birras en el chino, a Edgar, por descubrirme la gastronomía y autenticidad del San Juan, a Àlex, por enseñarnos cómo la planificación llega hasta la preparación semanal de comida en el domingo, a Helea, por ponerme firme cuando era necesario, a Silvia, por su entereza fosfínica, a Ernest, por situarme *Espinelvas* en el mapa, a Craig, *and we drink and we drink and we drink some more*, a Nuria, por ponerme de los nervios con cariño, a Agus, por su transmisión en el Know-How y sus momentos *il divo*, a Areli, por introducirme en la gastronomía de los chapulines, a Sean, el irlandés más auténtico que jamás haya conocido, a Phang, por sus seminarios e intervenciones en los mismos, a Ana, por su recién descubierta pasión por los tatuajes, a Rodolfo, que si bien no es del laboratorio es parte indispensable del mismo, y a los estudiantes de paso, Elsa, Andrea, Laia, Ronald, Tiffaine, Sammy, Iris, Eva, Elena, Roberta y María, que servís como fuente de anécdotas.

A la gente del laboratorio de María Macías, en especial a Eric y Pau por su apoyo en temas trascendentales de la tesis, y a David, Lidia, Thiago, Jordi y Albert por esas discusiones fortuitas sobre lo divino, lo humano y lo péptido.

Al personal de Enantia S.L., en especial a Alex, Esther, Rosa y Joan por su ayuda, y al personal de BCN Peptides S.A., destacando el papel de Jimena y Berta en la colaboración en esta tesis.

A Jesús, Jùlia y Miguel por esas cervezas en el chill-out, por ese desfogue post-trabajo y la rapsodia de momentos únicos vividos estos tres años. Muchas gracias por hacer la tesis más llevadera.

A Fran, alias Pirado, por enseñarme cómo sobrevivir a un laboratorio y a trabajar como es debido. Nunca cambies.

A Elma y Joselito, que continuaron con la labor de enseñanza y apoyo, siempre mezclado con las largas partidas al Tetris y escuchando a Nacho Vegas.

A la gente de la Guindalera, siempre 28028: Víctor, actualmente en el exilio y sin el cual el barrio se encuentra descabezado, Bisbal, la furia de Accenture, Edu, aún sin negligencias médicas a sus espaldas, los Albertos, siempre dispuestos a mostrarnos lo más oscuro y abyecto del ser humano, Azpe, también en el exilio y sin el cual el barrio se siente menos escocés y más keynesiano, Luiso, portador a perpetuidad de mi alma cambiada por un cartón de vino, Juanra, mourifiñista, wertiano, y Director del Instituto de Estudios Estratégicos José de Acero, y Manu, que supongo que saldremos esta noche a destripar.

A los Zunchos y al equipo Torrelozones: Antonio, artista conceptual, Rafa, el abogado más loco del país, Brunete, gran terrateniente, Marcos, luchador por la definición, Macaco, gran gestor económico, Luisma, cuya voz aterciopelada nos arrulla, Jimmy, qué será lo próximo, Simo, con su paciencia y su tabaco inagotables, Topo, compañero en la concordia y el respeto ajeno, y el Alex, al cual incluyo para que no me mande a contar baldosas.

A los integrantes del Baño: Alba, por ser tan incondicional en tu amistad y todo el amor que me profesáis tú y tu familia (a la cual también se lo agradezco), Inés, por poner la parte más racional y preocupada a los miembros de tan selecto club, Abelardo, que a pesar de haber ascendido a lo más alto en la política sigue hablando con nosotros, y Eva, actualmente desaparecida pero parte fundamental de la Kabbalah.

A Julia, mi hermana gemela toledana que, a pesar de la distancia, seguimos teniendo esa fuerte amistad surgida en las escaleras laterales de la facultad, y que no ha disminuido en fuerza ni un ápice.

A mi madre y a mis hermanos que, aun con las pocas expectativas laborales que teníais sobre mí (pam, la primera en la frente, fui reponedor de Louis Vuitton y no del Carrefour), han sido un gran apoyo en todos mis años de vida y me han permitido llegar a lo que hoy soy. Y también a Maricarmen, en su papel de mejor madrina que se podría tener.

A Mus.

Y a Aurora, sin la cual nada de esto hubiera tenido sentido. Incluso en la distancia, tu apoyo y tu cariño, el hecho de saber que siempre estabas ahí, y haber obtenido una conexión tan especial con una persona, me ha hecho y me hace sentir extremadamente feliz, y ansioso de empezar nuestra nueva etapa de viajes, aventuras y convivencia, siempre juntos. Gracias por estos años a tu lado, que espero que sigan sumando mucho tiempo. *Más que a mí.*

Muchas gracias a todos, y sólo me queda por añadir una cosa: *It is only Rock 'n' Roll.*

Índice.

Capítulo I. Introducción y objetivos.....	1
Capítulo II. Antecedentes.....	13
2.1. Primeros análogos de somatostatina.....	15
2.2. El <i>boom</i> de los octapéptidos.....	17
2.3. El efecto de las interacciones aromáticas.....	22
2.4. Estudios previos en somatostatina en nuestro grupo de investigación.....	26
Capítulo III. Análogos de somatostatina con L-Dfp-OH.....	37
3.1. Introducción.....	39
3.2. Síntesis de análogos de somatostatina con L- β -3',5'-difluorofenil alanina.....	42
3.3. Ensayos biológicos.....	45
3.4. Estrategia de estudio mediante RMN.....	46
3.5. Estructura.....	52
3.5.1. Análogo [L-Dfp6_D-Trp8]-SST (1).....	53
3.5.2. Análogo [L-Dfp7_D-Trp8]-SST (2).....	55
3.5.3. Análogo [L-Dfp11_D-Trp8]-SST (3).....	56
3.5.4. Análogo [L-Dfp6_L-Msa7_D-Trp8]-SST (4).....	57
3.5.5. Análogo [L-Dfp11_L-Msa7_D-Trp8]-SST (5).....	58
3.5.6. Análogo [L-Dfp6,11_L-Msa7_D-Trp8]-SST (6).....	60
3.5.7. Discusión.....	61
3.6. Conclusiones.....	63
Capítulo IV. Análogos de somatostatina con L-3'Pya-OH.....	65
4.1. Introducción.....	67
4.2. Síntesis de análogos de somatostatina con L- β -3'-piridilalanina....	70
4.3. Ensayos biológicos.....	72
4.4. Estructura.....	73
4.4.1. Análogo [L-3'Pya6_D-Trp8]-SST (7).....	75
4.4.2. Análogo [L-3'Pya7_D-Trp8]-SST (8).....	76

4.4.3. Análogo [L-3'Pya11_D-Trp8]-SST (9).....	77
4.4.4. Análogo [L-3'Pya6_L-Msa7_D-Trp8]-SST (10).....	78
4.4.5. Análogo [L-3'Pya11_L-Msa7_D-Trp8]-SST (11).....	80
4.4.6. Discusión.....	81
4.5. Conclusiones.....	83
Capítulo V. Análogos de somatostatina con L-4'Pya-OH.....	85
5.1. Introducción.....	87
5.2. Síntesis de análogos de somatostatina con L-β-4'-piridilalanina.....	89
5.3. Ensayos biológicos.....	90
5.4. Estructura.....	91
5.4.1. Análogo [L-4'Pya6_D-Trp8]-SST (12).....	93
5.4.2. Análogo [L-4'Pya7_D-Trp8]-SST (13).....	94
5.4.3. Análogo [L-4'Pya11_D-Trp8]-SST (14).....	97
5.4.4. Análogo [L-4'Pya6_L-Msa7_D-Trp8]-SST (15).....	98
5.4.5. Análogo [L-4'Pya11_L-Msa7_D-Trp8]-SST (16).....	99
5.4.6. Discusión.....	100
5.5. Conclusiones.....	103
Capítulo VI. Análogos de somatostatina polisustituidos.....	105
6.1. Introducción.....	107
6.2. Síntesis de análogos de somatostatina polisustituidos.....	109
6.3. Ensayos biológicos.....	111
6.4. Estructura.....	111
6.4.1. Análogo [L-3'Pya6_L-Msa7_D-Trp8_L-Tmp11]-SST (17).....	113
6.4.2. Análogo [L-3'Pya11_L-Msa7_D-Trp8_L-Tmp6]-SST (18).....	114
6.4.3. Análogo [L-4'Pya6_L-Msa7_D-Trp8_L-Tmp11]-SST (19).....	115
6.4.4. Análogo [L-4'Pya11_L-Msa7_D-Trp8_L-Tmp6]-SST (20).....	116
6.4.5. Discusión.....	116
6.5. Conclusiones.....	118
Capítulo VII. Análogos de cortistatina.....	121
7.1. Introducción.....	123

7.2. Síntesis de análogos de cortistatina.....	128
7.3. Ensayos biológicos.....	131
7.4. Estructura.....	134
7.4.1. rCST14 (21).....	135
7.4.2. [L-Msa6_D-Trp7_L-Thr11]-CST14 (22).....	136
7.4.3. octanoil-[L-Msa6_D-Trp7_L-Thr11]-CST14 (23).....	137
7.4.4. [L-Msa5_D-Trp7_L-Thr11]-CST14 (24).....	138
7.4.5. octanoil-[L-Msa5_D-Trp7_L-Thr11]-CST14 (25).....	139
7.4.6. octanoil-[L-Msa5_D-Trp7_L-Thr11]-CST13 (26).....	140
7.5. El uso de [L-Dfp7_D-Trp8]-SST14 (2).....	141
7.6. Conclusiones.....	144
Capítulo VIII. Conclusiones globales.....	147
Capítulo IX. Parte experimental.....	151
9.1. Síntesis de aminoácidos no naturales.....	153
9.1.1. Métodos generales e instrumentación.....	153
9.2. Síntesis de análogos de somatostatina y cortistatina.....	154
9.2.1. Métodos generales e instrumentación.....	154
9.2.2. Consideraciones generales para la síntesis de péptidos en fase sólida.....	156
9.2.3. Método general de síntesis de análogos de somatostatina y cortistatina.....	158
9.2.4. Métodos biológicos empleados.....	159
9.2.5. Análogos de somatostatina (SST14).....	162
9.2.6. Análogos de cortistatina (CST14).....	202
Anexo I. Observaciones finales.....	215
Anexo II. Lista de péptidos.....	219
Anexo III. Ejemplos seleccionados de asignación ^1H - ^1H	223

Abreviaturas y unidades empleadas.

a.a.	Aminoácido	GnRH	Hormona liberadora de gonadotropina
AcO ⁻	Ion acetato	HATU	1-[Bis(dimetilamino)metilen]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridinio 3-óxido hexafluorofosfato
AcOH	Ácido acético	hCST17	Costistatina humana de 17 residuos
aq	Acuoso	hCST29	Cortistatina humana de 29 residuos
Boc	Terc-butoxicarbonilo	HMBC	Coherencia de múltiples enlaces heteronuclear
CCF	Cromatografía de capa fina	HOBt	Hidroxibenzotriazol
COSY	Espectroscopía de correlación	HRMS	Espectrometría de masas de alta resolución
CST	Cortistatina	HSQC	Coherencia de cuanto único heteronuclear
CST14	Cortistatina de 14 residuos	IFN γ	Interferón γ
DCM	Diclorometano	IL-2	Interleucina-2
DIC	N,N'-Diisopropilcarbodiimida	IL-6	Interleucina-6
DIPEA	N,N-Diisopropiletilamina	IL-10	Interleucina-10
DMF	N,N-Dimetilformamida	Ki	Constante de inhibición
EC	Enfermedad de Crohn	kV	Kilovoltios
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas	LC-MS	Cromatografía líquida - Espectrometría de masas
Et ₂ O	Éter etílico	LHRH	Hormona liberadora de la hormona luteinizante
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>	LPS	Lipopolisacárido
Fmoc	Fluorenilmetoxicarbonilo	m/z	Ratio masa/carga
g	Gramos	MALDI-MS	Espectrometría de masas de desorción/ionización láser asistida por matriz
GH	Hormona de crecimiento	MBq	Megabecquerel
GHIH	Hormona inhibidora de la hormona de crecimiento/somatostatina	mCST14	Cortistatina de ratón de 14 residuos

MeOH	Metanol	SST28	Somatostatina de 28 residuos
mg	Miligramos	SSTR	Receptor de somatostatina
min	Minutos	t	Temperatura
mL	Mililitros	t.a.	Temperatura ambiente
mM	Milimolar	tBu	Terc-butilo
ms	Milisegundo	TFA	Ácido trifluoroacético
nm	Nanómetros	TFA-	Ion trifluoroacetato
nM	Nanomolar	TFE	2,2,2-Trifluoroetanol
NOE	Efecto nuclear Overhauser	THF	Tetrahidrofurano
NOESY	Espectroscopía de efecto nuclear Overhauser	TNBS	Ácido 2,4,6-trinitrobenceno sulfónico
°C	Grados Celsius	TNF α	Factor de necrosis tumoral α
PBS	Solución tamponada de fosfato	TOCSY	Espectroscopía de correlación total
ppm	Partes por millón	TOF	Tiempo de vuelo
r,mCST14	Cortistatina murina de 14 residuos	t _R	Tiempo de retención
r.p.m.	Revoluciones por minuto	Trt	Tritilo
RCM	<i>Ring-Closed Metathesis</i> /metátesis de cierre de anillo	u.m.a.	Unidad de masa atómica
rCST14	Cortistatina de rata de 14 residuos	UV	Ultravioleta
rCST29	Cortistatina de rata de 29 residuos	V	Voltios
REM	<i>Rapid Eye Movements</i> /sueño paradójico	VIP	Péptido vasoactivo intestinal
RMN	Resonancia magnética nuclear	λ	Longitud de onda
RP-HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia - Fase reversa	μ Ci	Microcurio
SRIF	Factor inhibidor de la liberación de somatotropina/somatostatina	μ g	Microgramos
SST	Somatostatina	μ L	Microlitros
SST14	Somatostatina de 14 residuos	μ M	Micromolar

Capítulo I.

Introducción y objetivos.

So never mind the darkness, we still can find a way.

Nothin' lasts forever, even cold November rain.

November Rain, Axl Rose (Guns N' Roses).

La somatostatina (SST) es una hormona endógena de naturaleza peptídica, aislada por primera vez en su forma tetradecapeptídica de extractos de hipotálamo humano en 1973 (figura 1.1).¹ Debido al temprano descubrimiento de su acción como inhibidora de la secreción de somatotropina u hormona de crecimiento (*Growth hormone, GH*) en células somatótropas,² fue también denominada factor inhibidor de la liberación de somatotropina (*Somatotropin Release-Inhibiting Factor, SRIF*) u hormona inhibidora de la hormona de crecimiento (*Growth Hormone-Inhibiting Hormone, GHIH*).

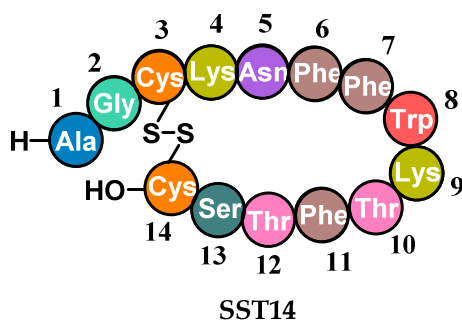


Figura 1.1. Estructura de SST14

La forma más estudiada de SST es la SST14, aunque su prehormona de 28 aminoácidos SST28 presenta también actividad biológica.³ La SST no sólo es secretada a nivel hipofisario desde el núcleo ventromedial entre otros,⁴ sino además desde distintas regiones del tubo digestivo, por células δ del páncreas y otras glándulas endocrinas.⁵ Esto se traduce en un amplio abanico de acciones fisiológicas que incluye la inhibición de secreción de factores endógenos como la

¹ a) P. Brazeau, W. Vale, R. Burgus, N. Ling, M. Butcher, J. Rivier, R. Guillemin, *Science*, **1973**, 179, 77-79; b) R. Burgus, N. Ling, M. Butcher, R. Guillemin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1973**, 70, 684-688.

² T. M. Siler, G. Vandenberg, S. S. C. Yen, P. Brazeau, W. Vale, R. Guillemin, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **1973**, 37, 632-634.

³ a) A. V. Schally, A. Dupont, A. Arimura, T. W. Redding, G. L. Linthicum, *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, **1975**, 34, 584; b) A. Arimura, H. Sato, A. Dupont, N. Nishi, A. V. Schally, *Science*, **1975**, 189, 1007-1009; c) A. V. Schally, A. Dupont, A. Arimura, T. W. Redding, N. Nishi, G. L. Linthicum, D. H. Schlesinger, *Biochemistry*, **1976**, 15, 509-514; d) L. Pradayrol, H. Jornvall, V. Mutt, A. Ribet, *FEBS Lett*, **1980**, 109, 55-58.

⁴ a) J. C. W. Finley, J. L. Maderdrut, L. J. Roger, P. Petrusz, *Neurosci.*, **1981**, 6, 2173-2192; b) O. Johansson, T. Hokfelt, R. P. Elde, *Neurosci.*, **1984**, 13, 265-339.

⁵ a) T. Hokfelt, S. Effendic, C. Hellerstrom, O. Johansson, R. Luft, A. Arimura, *Acta Endocrinol.*, **1975**, 80, 5-41; b) Y. C. Patel, S. Reichlin, *Endocrinology*, **1978**, 102, 523-530; c) S. Reichlin, *N. Engl. J. Med.*, **1983**, 309, 1495-1501, 1556-1563.

ya mencionada GH, la insulina, el glucagón o la gastrina, e inhibición de secreción exógena de ácido gástrico o enzimas pancreáticas.⁵ Esta función inhibitoria se ejerce mediante receptores transmembrana de la superfamilia de las proteínas G,⁶ de los cuales se han identificado hasta la fecha cinco subreceptores muy extendidos para SST, conocidos como SSTR1-5.⁷ A su vez, gracias a los estudios llevados a cabo mediante la eliminación sistemática de residuos se determinó que el farmacóforo de la molécula se componía de los cuatro aminoácidos que forman el β -giro, es decir la secuencia Phe7_Trp8_Lys9_Thr10.⁸ La identificación de distintas funciones y sus mecanismos asociados introdujeron a la SST en la terapéutica.

Debido a su semivida plasmática inferior a tres minutos, y a la falta de control sobre la selectividad entre los distintos receptores, el uso de SST natural en la farmacoterapia se encuentra restringido. Por ello, la síntesis de análogos se focalizó en un acortamiento de la secuencia, manteniendo la estructura anular y el farmacóforo, con el objeto de crear derivados más eficaces que presentasen un aumento de la semivida plasmática, así como la selectividad frente a los diferentes SSTR. La mejora en la estabilidad es una ventaja sobre la hormona natural, ya que reduciría el número de dosis. Los objetivos clínicos han sido enfermedades funcionales como tumores con sobresecreción hormonal, diabetes, gastrinomas o adenomas pituitarios. De todo el catálogo creado, han sido cuatro

⁶ Las proteínas G que conforman los SSTR están asociadas a la ruta del AMPc principalmente, de manera que inhiben la ciclación y por tanto formación de dicha molécula, desempeñando por esta vía la regulación a la baja. Sin embargo, no se trata del único mecanismo regulador de los SSTR, ya que también se asocian a canales de iones Ca⁺ y K⁺, bomba Na⁺/H⁺, entre otros.

⁷ a) Y. C. Patel, K. K. Murthy, E. Escher, D. Banville, J. Spiess, C. B. Srikant, *Metabolism*, **1990**, 39, 63–69; b) Y. C. Patel, *Basic. Clin. Asp. Neurosci.*, **1992**, 4, 1–16; c) Y. C. Patel, M. T. Greenwood, R. Panetta, L. Demchyshyn, H. Niznik, C. B. Srikant, *Life Sci.*, **1995**, 57, 1249–1265; d) J. C. Reubi, U. Horisberger, A. Kappeler, J. A. Laissue, *Blood*, **1998**, 92, 191–197; e) A. Schonbrunn, A. H. Tashjian, *J. Biol. Chem.*, **1978**, 253, 6473–6483.

⁸ a) W. Bauer, U. Briner, W. Doepfner, R. Halber, R. Huguenin, P. Marbach, T. J. Petcher, J. Pless, *Life Sci.*, **1982**, 31, 1133–1140; b) D. Veber, R. Saperstein, R. Nutt, R. Friedinger, S. Brady, P. Curley, D. Perlow, W. Palveda, C. Colton, A. Zacchei, D. Tocco, D. Hoff, R. Vandlen, J. Gerich, L. Hall, L. Mandarino, E. Cordes, P. Anderson, R. Hirschmann, *Life Sci.*, **1984**, 34, 1371–1378; c) J. E. Taylor, D. H. Coy, *J. Endocrinol. Invest.*, **1997**, 20, 8–10.

los análogos peptídicos que han llegado al mercado para el tratamiento de diferentes enfermedades metabólicas: tres octapéptidos que mantienen el puente disulfuro, el octreótido (nombre comercial Sandostatin®),^{8a,9} el lanreótido (Somatuline®)¹⁰ y el vapreótido (Sanvar®),¹¹ y un hexapéptido cíclico, el pasireótido (Signifor®),¹² cuyas estructuras están representadas en la figura 1.2. Los ensayos de afinidad llevados a cabo demostraron que tanto el octreótido como el lanreótido mostraban un perfil farmacológico selectivo para la unión con SSTR2, SSTR5 y, en menor medida, SSTR3.¹³

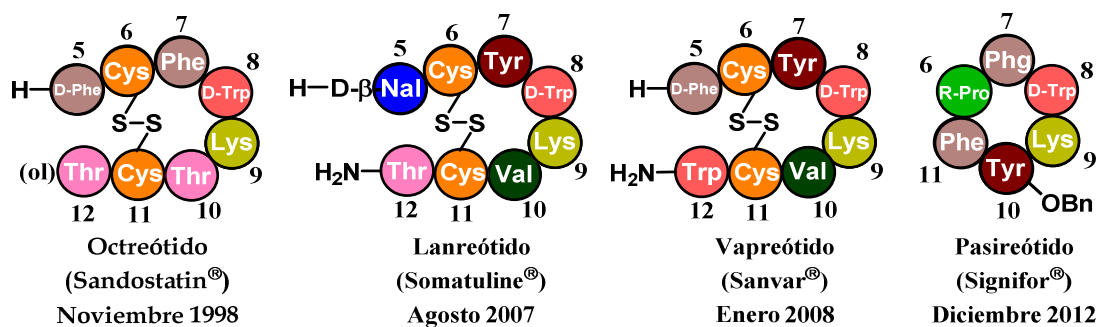


Figura 1.2. Derivados comerciales de SST, en los cuales se observa el mantenimiento de la estructura cíclica y la región farmacófora de los aminoácidos 7-10. Las fechas corresponden a la aprobación de comercialización de la FDA. D-β-Nal: 3-(2'-naftil)-D-alanina. Phg: L-fenilglicina. R-Pro: 3-[(2-aminoetil)aminocarbonilo]oxi-L-prolina.

El grueso de los estudios se enfocó principalmente en analizar secuencias acortadas respecto a la SST nativa, relegándose a un segundo plano el uso de derivados que presentasen catorce residuos. Sin embargo, es mediante el estudio de la forma tetradecapéptido por el que se puede alcanzar un mayor conocimiento de la SST, tanto estructuralmente como en su perfil de actividad.

La SST14 nativa es un péptido que presenta una elevada flexibilidad conformacional, y dado que no se ha podido caracterizar una estructura mayoritaria, se ha postulado que la SST14 en solución se encuentra en un estado

⁹ S. W. J. Lamberts, A. J. van der Lely, W. W. de Herder, *N. Eng. J. Med.*, **1996**, 334, 246-254.

¹⁰ J. Marek, V. Hána, M. Kršek, V. Justová, F. Catus, F. Thomas, *Eur. J. Endocrinol.*, **1994**, 131, 20-26.

¹¹ P. M. Girard, E. Goldschmidt, D. Vittecoq, P. Massip, J. Gastiaburu, M. C. Meyohas, J. P. Coulaud, A. V. Schally, *AIDS*, **1992**, 6, 715-718.

¹² C. Bruns, I. Lewis, U. Briner, G. Meno-Tetang, G. Weckbecker, *Eur. J. Endocrinol.*, **2002**, 146, 707-716.

¹³ C. Bruns, F. Raulf, D. Hoyer, J. Schloos, H. Lubbert, G. Weckbecker, *Metabolism*, **1996**, 45, 17-20.

de equilibrio entre distintas conformaciones.¹⁴ Sin embargo, a parte de la restricción conformacional que supone la presencia de un puente disulfuro, se determinó la existencia de interacciones aromáticas entre Phe6, Phe7 y Phe11.¹⁵ Así, la sustitución de los residuos 6 y 11 por sendas alaninas resulta en una pérdida completa de la actividad biológica,¹⁶ la cual se mantiene si el cambio es hecho por cisteínas unidas en un puente disulfuro.¹⁵ A su vez, otros estudios apuntaban más hacia una interacción entre Phe6 y Phe7, debido a estudios por resonancia magnética nuclear (RMN) bidimensionales en los cuales no se detectó ninguna señal NOE ¹H-¹H entre Phe11 y otros protones aromáticos.¹⁷ El hecho de que aquellos derivados octapéptidos con puente disulfuro en posiciones 6 y 11 mantuviesen la actividad biológica frente a SSTR2, decantó los estudios hacia los octapéptidos prioritariamente, y dio preferencia a la teoría de interacción 6-11 sobre 6-7.

Nuestro grupo de investigación, en un proyecto de colaboración con BCN Peptides S.A., inició el estudio sobre los derivados tetradecapeptídicos de somatostatina, debido a que en comparación con los octapéptidos los análogos de catorce residuos han sido poco estudiados. Uno de los primeros pasos que se dio fue tratar de entender el papel crítico del Trp8 sobre la estabilización del β-giro de la estructura, dado que al usar su enantiómero la actividad de la molécula [D-Trp8]-SST no difiere de la SST nativa; de hecho, aumenta la estabilidad al

¹⁴ a) K. Hallenga, G. Van Binst, A. Scarso, A. Michel, M. Knappenberg, C. Dremier, J. Brison, J. Dirckx, *FEBS Lett.*, **1980**, *119*, 47-52; b) M. Knappenberg, A. Michel, A. Scarso, J. Brison, J. Zanen, K. Hallenga, P. Deschrijver, G. Van Binst, *Biochim. Biophys. Acta, Protein Struct. Mol. Enzymol.*, **1982**, *700*, 229-246; c) L. A. Buffington, V. Garsky, J. Rivier, W. A. Gibbons, *Biophys. J.*, **1983**, *41*, 299-304; d) L. A. Buffington, V. Garsky, J. Rivier, W. A. Gibbons, *Int. J. Pept. Protein Res.*, **1983**, *21*, 231-241.

¹⁵ a) J. E. Rivier, M. R. Brown, W. W. Vale, *J. Med. Chem.*, **1976**, *19*, 1010-1013; b) D. F. Veber, F. W. Holly, W. J. Paleveda, R. F. Nutt, S. J. Bergstrand, M. Torchiana, M. S. Glitzer, R. Saperstein, R. Hirschmann, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1978**, *75*, 2636-2640.

¹⁶ W. W. Vale, C. Rivier, M. R. Brown, J. E. Rivier, *Hypothalamic Peptide Hormones and Pituitary Regulation, Advances in Experimental Medicine and Biology*. Plenum Press **1977**, pp 123-156.

¹⁷ a) A. W. H. Jans, K. Hallenga, G. Van Binst, A. Michel, A. Scarso, J. Zanen, *Biochim. Biophys. Acta, Protein Struct. Mol. Enzymol.*, **1985**, *827*, 447-452; b) E. M. M. Van den Berg, A. W. H. Jans, G. Van Binst, *Biopolymers*, **1986**, *25*, 1895-1908; c) J. E. Rivier, M. R. Brown, W. W. Vale, *J. Med. Chem.*, **1976**, *19*, 1010-1013.

tener una interacción alifática-aromática más fuerte con Lys9.¹⁸ En consecuencia, en la tesis doctoral de Rosario Ramón¹⁹ se planteó la síntesis de dos derivados con L y D-3-(3'-quinolil)-alanina, [L-Q1a8]-SST y [D-Q1a8]-SST. Este aminoácido es de un tamaño similar al triptófano, pero presenta propiedades electrónicas opuestas al ser sus anillos pobres en electrones, además de carecer del enlace N-H el cual se había propuesto como clave en la activación de los receptores.²⁰ El resultado en ambos casos fue de péptidos con mayor flexibilidad conformacional: [L-Q1a8]-SST presentaba un mantenimiento de la actividad en SSTR1 y 3, pero pérdida de afinidad con SSTR2, 4 y 5; [D-Q1a8]-SST mantenía un perfil de unión similar a [L-Q1a8]-SST, salvo en SSTR5, que emulaba al octreótido.²¹

También se investigó el papel del puente disulfuro. Aplicando los conocimientos de diseño en análogos octapeptídicos ciclados mediante un doble enlace,²² se sintetizó un tetradecapéptido dicarba-análogo, mediante la ciclación por metátesis del derivado que en posiciones 3 y 14 presentaba el aminoácido no natural L-alilglicina, [L-alilGly3,14]-SST.²³ De nuevo, el resultado fue un péptido de mayor flexibilidad conformacional y con un perfil farmacológico similar a SST

¹⁸ a) B. H. Arison, R. Hirschmann, D. F. Veber, *Bioorg. Chem.*, **1978**, *7*, 447-451; b) O. Ovadia, S. Greenberg, B. Laufer, C. Gilon, A. Hoffman, H. Kessler, *Expert Opin. Drug Discov.*, **2010**, *5*, 655-671.

¹⁹ R. Ramón, tesis doctoral *Síntesis de aminoácidos no naturales y aplicación a la síntesis de péptidos con interés farmacológico*, Universidad de Barcelona, 2009.

²⁰ B. H. Hirst, B. Shaw, C. A. Meyers, D. H. Coy, *Regul. Pept.*, **1980**, *1*, 97-113.

²¹ R. Ramón, P. Martín-Gago, X. Verdaguer, M. J. Macías, P. Martín-Malpartida, J. Fernández-Carneado, M. Gómez-Camins, B. Ponsati, P. López-Ruiz, M. A. Cortés, B. Colás, A. Riera, *ChemBioChem*, **2011**, *12*, 625-632

²² a) R. F. Nutt, D. F. Veber, R. Saperstein, *J. Am. Chem. Soc.*, **1980**, *21*, 6539; b) V. M. Garsky, D. E. Clark, N. H. Grant, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1976**, *4*, 911; c) D. F. Veber, R. G. Strachan, S. J. Bergstrand, F. W. Holly, C. F. Homnick, R. Hirschmann, M. L. Torchiana, R. Saperstein, *J. Am. Chem. Soc.*, **1976**, *8*, 2367; d) A. N. Whelan, J. Elaridi, R. J. Mulder, A. J. Robinson, W. R. Jackson, *Can. J. Chem.*, **2005**, *6-7*, 875; e) D. D'Addona, A. Carotenuto, E. Novellino, V. Piccand, J. C. Reubi, A. di Cianni, F. Gori, A. M. Papini, M. Ginanneschi, *J. Med. Chem.*, **2008**, *51*, 512; f) A. di Cianni, A. Carotenuto, D. Braccaccio, E. Novellino, J. C. Reubi, K. Beetschen, A. M. Papini, M. Ginanneschi, *J. Med. Chem.*, **2010**, *53*, 6188.

²³ P. Martín-Gago, R. Ramón, E. Aragón, J. Fernández-Carneado, P. Martín-Malpartida, X. Verdaguer, P. López-Ruiz, B. Colás, M. A. Cortés, B. Ponsati, M. J. Macías, A. Riera, *Bioorg. & Med. Chem. Lett.*, **2014**, *24*, 103-107.

en SSTR1 y 5, pero menos afín en los otros receptores, siendo especialmente bajo para SSTR2.

Sin lugar a dudas la modificación que contribuyó a una comprensión más profunda de la SST fue el efecto del aminoácido L-3-mesitilalanina, estudiado en la tesis de Pablo Antonio Martín-Gago.²⁴ Sustituyendo Phe6, Phe7 o Phe11 por L-Msa, además de modificar L-Trp8 por D-Trp8, se obtuvieron péptidos de una elevada rigidez conformacional que, por vez primera, su estructura pudo determinarse mediante datos de RMN. Esta rigidez se explica por el impedimento estérico del anillo de mesitilo, así como la riqueza en electrones de su anillo, que aumenta la intensidad de las interacciones aromáticas.

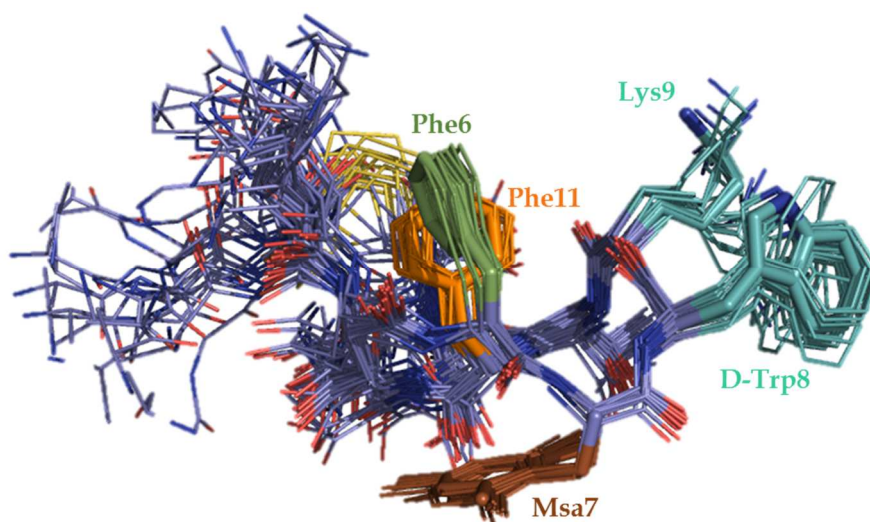


Figura 1.3. Estructura tridimensional de [L-Msa7_D-Trp8]-SST, con una aproximación entre Phe6 y Phe11 *edge-to-face*, obtenida mediante RMN.

Mientras que en los péptidos [L-Msa6_D-Trp8]-SST y [L-Msa11_D-Trp8]-SST la mesitilalanina interviene directamente en la potenciación de la interacción π - π aromática, resultó especialmente notorio cómo en [L-Msa7_D-Trp8]-SST (figura 1.3) la interacción Phe6 – Phe11 se incrementaba gracias a la intervención indirecta de Msa7, que al colocarse en la cara opuesta de la molécula permitía un acercamiento mayor entre los otros dos residuos aromáticos. Además, la afinidad de este derivado por SSTR2 supera al octreótido, alcanzando el valor nominal de

²⁴ P. A. Martín-Gago, tesis doctoral *Synthesis of highly structured and receptor-selective tetradecapeptidic analogs of somatostatin: Fine-tuning the non-covalent interactions among their aromatic residues*, Universidad de Barcelona, 2013.

la SST nativa, no compartido con los otros dos derivados, que presentan mayor afinidad por SSTR3 y 5.^{24,25} Esto permitió sentar unas bases de diseño racional sobre derivados tetradecapetílicos, teniendo en cuenta los distintos perfiles farmacológicos alcanzados sobre las estructuras obtenidas.

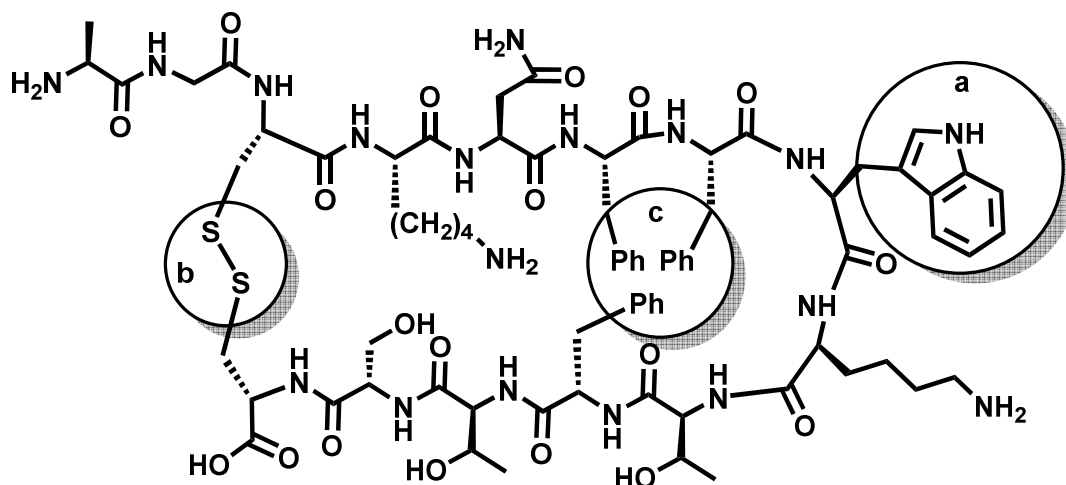


Figura 1.4. Las modificaciones realizadas en nuestro grupo sobre SST14 nativa incluyeron la sustitución de L-Trp8 por L-Q1a y D-Q1a (a), realizar una ciclación mediante metátesis de dos L-alilglicinas en posiciones 3 y 14 (b) y el uso de anillos de mayor densidad electrónica que los presentes en las fenilalaninas naturales (c).

En la presente tesis doctoral decidimos llevar a cabo sustituciones sobre los aminoácidos clave Phe6, Phe7 y Phe11, tratando de explotar la interacción aromática que entre ellos pudiese darse. Sabiendo que el uso de aminoácidos aromáticos no naturales se puede traducir en una reducción de la flexibilidad conformacional respecto a la SST14 nativa, además de modificar el perfil farmacológico, se decidió incluir una serie de aminoácidos con presencia de anillos aromáticos pobres en electrones para descubrir su potencial para estabilizar las estructuras hacia una conformación mayoritaria. Estos aminoácidos son: la L- β -3',5'-difluorofenilalanina, con lo que se completaría el trabajo iniciado por el Dr. Pablo Antonio Martín-Gago,²⁴ la L- β -3'-piridilalanina y la L- β -4'-piridilalanina. Además, se pensó en incluir el aminoácido L- β -mesitilalanina en posición 7 en derivados seleccionados, y la L- β -3',4',5'-

²⁵ P. Martín-Gago, M. Gómez-Caminals, R. Ramón, X. Verdaguer, P. Martín-Malpartida, E. Aragón, J. Fernández-Carneado, B. Ponsati, P. López-Ruiz, M. A. Cortés, B. Colás, M. J. Macías, A. Riera, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2012**, *51*, 1820-1825.

trimetilfenilalanina como contrapartida rica en electrones en derivados polisustituidos (figura 1.5).

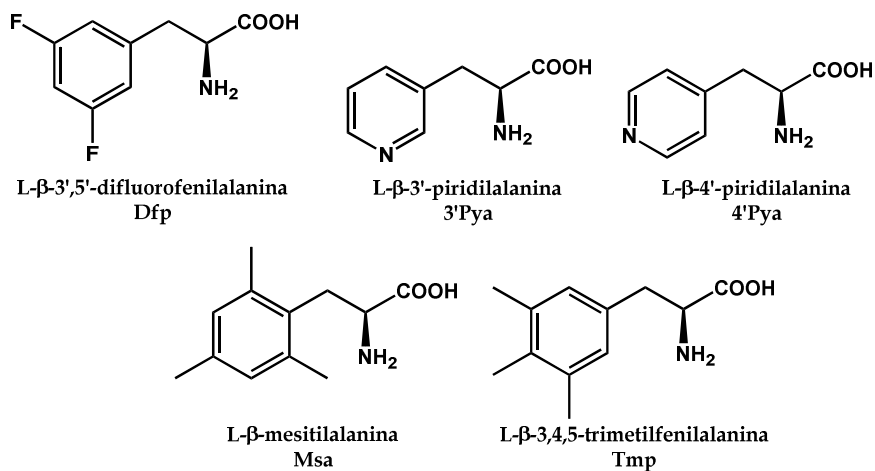


Figura 1.5. Estructura de los aminoácidos no naturales seleccionados para introducir en la secuencia nativa.

La información obtenida previamente, junto con los datos de los nuevos péptidos que incluirán la afinidad frente a los SSTR y la estructura, se compararán con la información disponible en la literatura. Así, concluirá la primera parte de esta tesis, que abarcará los **capítulos III, IV, V y VI**.

La cortistatina (CST) es otra hormona peptídica de la familia de la somatostatina. Descubierta en 1996, se observó una elevada similitud de estructura primaria con SST14 en su forma tetradecapeptídica CST14 (figura 1.6), aunque sustituye intracíclicamente una treonina por serina, y extracíclicamente el extremo N-terminal es formado por una prolina, y el C-terminal presenta una lisina.²⁶ A pesar de esta similitud secuencial, la CST14 tiene un abanico de acciones fisiológicas no presentes en la SST14, entre las que destacan a nivel cortical el aumento de la duración de la fase IV del sueño, hipomovilidad a causa de su actividad anticolinérgica, o relación con la memoria a largo plazo.²⁷

²⁶ a) L. de Lecea, J. R. Criado, Ó. Próspero-García, K. M. Gautvik, P. Schweitzer, P. E. Danielson, C. L. M. Dunlop, G. R. Siggins, S. J. Henriksen, J. G. Sutcliffe, *Letters to Nature*, **1996**, 381, 242-245; b) L. de Lecea, P. Ruiz-Lozano, P. E. Danielson, J. Peelle-Kirley, P. E. Foye, W. N. Frankel, J. G. Sutcliffe, *Genomics*, **1997**, 42, 499-506.

²⁷ a) C. Rauca, K. Schafer, V. Holtt, *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, **1999**, 360, 633-638; b) J.F. Flood, K. Uezu, J. E. Morley, *Brain Res.*, **1997**, 775, 250-252; c) M. Sánchez-Álave, M. Gómez-Chavarín, L. Navarro,

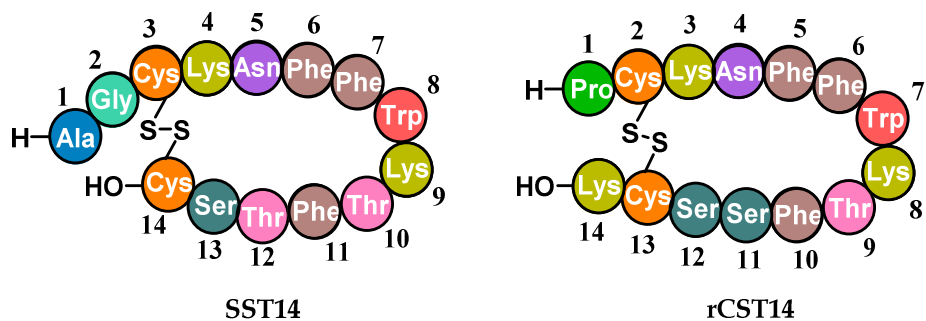


Figura 1.6. Comparación de la secuencia de SST14 humana con CST14 murina. Debido a la presencia de un único residuo extracíclico en el extremo N-terminal, la numeración de los aminoácidos intracíclicos se encuentra desplazada por un número.

Entre otros, la CST14 destaca por su papel inmunorregulador, actividad no presente en la SST14.²⁸ El porqué de esta diferenciación de roles ha sido objeto de conjeturas, dado que ambas hormonas tienen un perfil farmacológico similar frente a SSTR,²⁹ y el papel que jugarían otros hipotéticos receptores no está nada claro.³⁰

La empresa BCN Peptides S.A. se encargó de la síntesis de una serie de análogos de CST14 siguiendo el mismo planteamiento que con los derivados de SST14, en los que se incluyó un residuo de mesitilalanina en distintas posiciones. Al estudiar su actividad biológica frente a distintos parámetros de enfermedades intestinales inflamatorias, concretamente en enfermedad de Crohn, se observó

A. Jiménez-Anguiano, E. Murillo-Rodríguez, R. A. Prado-Alcalá, R. Drucker-Colin, O. Próspero-García, *Brain Res.*, **2000**, 858, 78-83.

²⁸ a) V. A. Dalm, P. M. van Hagen, P. M., van Koetsveld, S. Achilefu, A. B. Houtsmuller, D. H. Pols, A. J. van der Lely, S. W. Lamberts, L. J. Hofland, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **2003**, 285, 344-353; b) V. A. Dalm, P. M. van Hagen, P. M. van Koetsveld, A. W. Langerak, A. J. van der Lely, S. W. Lamberts, L. J. Hofland, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **2003**, 88, 270-276; c) E. González-Rey, N. Varela, A. F. Sheibanie, A. Chorny, D. Ganea, M. Delgado, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2006**, 103, 4228-4233.

²⁹ a) S. Fukusumi, C. Kitada, S. Takekawa, H. Kizawa, J. Sakamoto, M. Miyamoto, S. Hinuma, K. Kitano, M. Fujino, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1997**, 232, 157-163; b) J. R. Criado, H. Li, X. Jiang, M. Spina, S. Huitrón-Reséndiz, G. Liapakis, M. Calbet, S. Siehler, S. J. Henriksen, G. Koob, D. Hoyer, J. G. Sutcliffe, M. Goodman, L. de Lecea, *J. Neurosci. Res.*, **1999**, 56, 611-619.

³⁰ a) R. Deghenghi, M. Papotti, E. Ghigo, G. Muccioli, *J. Endocrinol. Invest.*, **2001**, 24, RC1-RC3; b) H. P. Nothacker, Z. Wang, H. Zeng, S. K. Mahata, D. T. O'Connor, O. Civelli, *Eur. J. Pharmacol.*, **2005**, 519, 191-193.

que algunos derivados presentaban una potente actividad antiinflamatoria. Dado el interés que suscitaron los resultados en estos análogos no naturales, iniciamos un proyecto de colaboración con dicha compañía, para intentar racionalizar este perfil de actividad. Se decidió estudiar sus derivados mediante espectroscopía con el fin de determinar una posible conformación tridimensional mayoritaria. Estos estudios constituirán la segunda parte de la tesis, recogida en el **capítulo VII**.

En conclusión, los objetivos para la presente tesis son los siguientes:

1. Sintetizar derivados tetradecapeptídicos de SST14 incluyendo en la estructura los aminoácidos no naturales L- β -3',5'-difluorofenilalanina, L- β -3'-piridilalanina, L- β -4'-piridilalanina, L- β -mesitilalanina y L- β -3',4',5'-trimetilfenilalanina.

2. Establecer el perfil farmacológico de unión a receptores mediante ensayos de afinidad con SSTR1-5.

3. Determinar la posible presencia de una conformación tridimensional mayoritaria a través del uso de técnicas espectroscópicas (espectros homonucleares bidimensionales ^1H - ^1H), mediante el volcado de esta información en programas de cálculo. A su vez, determinar la geometría de la interacción aromática presente en estructuras estabilizadas.

4. Relacionar la actividad obtenida con la estructura mayoritaria (si la hubiera). En última instancia, elaborar motivos estructurales con un perfil farmacológico concreto, a la vez que relacionen las sustituciones presentes con las estructuras obtenidas.

5. Aplicar estas metodologías en análogos de CST14, con el fin de tratar de obtener para los casos seleccionados una estructura tridimensional y tratar de establecer un patrón que correlacione estructura y actividad biológica.

Capítulo II.

Antecedentes.

*El mundo era tan reciente que muchas cosas carecían de nombre,
y para mencionarlas había que señalarlas con el dedo.*

Cien años de soledad, Gabriel García Márquez.

2.1. Primeros análogos de somatostatina.

Al descubrirse el potencial que la SST14 presentaba como inhibidora de la secreción de otras hormonas endógenas, este péptido se reveló como una nueva vía terapéutica para el tratamiento de algunas enfermedades endocrinas. Sin embargo, su semivida en sangre (inferior a tres minutos) obligaría a un tratamiento de perfusión continua, y el amplio catálogo de efectos endógenos provoca una lista de efectos adversos no deseados igual de amplia. Esto condujo a que los primeros estudios se centraran en la búsqueda de análogos que presentasen una mayor semivida plasmática (que se tradujese en una mayor potencia), así como en determinar patrones comunes para los distintos derivados que aumentasen la selectividad para una actividad fisiológica concreta.

La primera modificación que produjo un aumento de la semivida plasmática de la hormona mientras se mantenía la actividad biológica fue la sustitución de L-Trp8 por D-Trp8 (figura 2.1), debido a un incremento significativo de la estabilidad inducido por el D-aminoácido. Se comprobó que la [D-Trp8]-SST aumentaba entre cinco y ocho veces la potencia inhibidora frente a la liberación de GH, insulina y glucagón *in vitro* respecto a SST nativa.¹

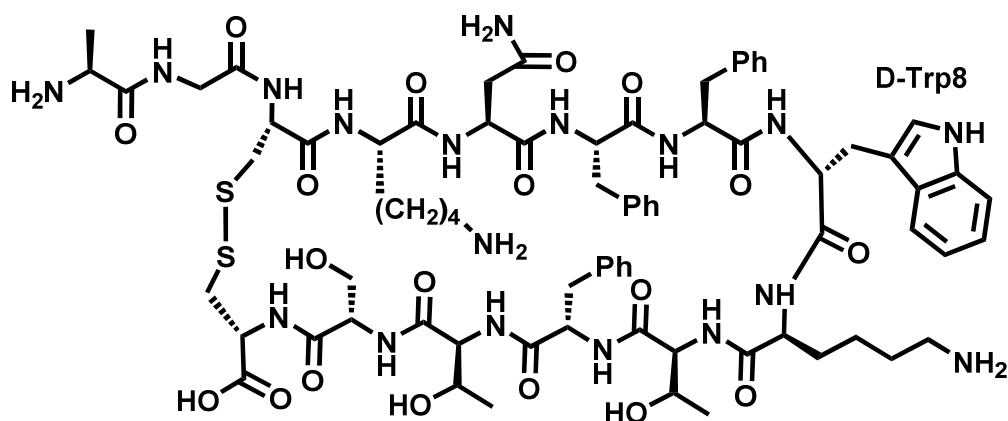


Figura 2.1. Estructura de [D-Trp8]-SST.

Posteriormente se demostró que dicha estabilización provenía de una aproximación mayor entre D-Trp8 y L-Lys9 que la que tiene lugar con L-Trp8 en

¹ a) J. Rivier, M. Brown, W. Vale, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1975**, *65*, 746-751; b) D. H. Coy, E. J. Coy, C. Meyers, J. Drouin, L. Ferland, A. Gómez-Pan, A. V. Schally, *Endocrinology*, **1976**, *98*, 305A.

la SST nativa. El aminoácido D permitía una interacción alifática-aromática más fuerte, estabilizando el β -giro al centrarse en él estos dos residuos y definirse mejor su orientación.²

Al mismo tiempo que se comprobó la eficaz sustitución del triptófano por su isómero óptico, se comprobó el efecto de sustituir individualmente cada aminoácido por L-alanina. Gly2, Lys4, Asn5, Thr10, Thr12 y Ser13 sustituidos por Ala no provocaban una disminución de potencia muy marcada respecto a SST natural; Phe6, Phe7, Trp8, Lys9 y Phe11, al cambiarse por Ala, resultaban en péptidos con una capacidad inhibitoria sobre GH inferior al 4%.³

Otra serie de análogos incluían la sustitución de L-Cys14 por D-Cys14, y Gly2 por L-Ala2. Vale y colaboradores⁴ demostraron que [D-Cys14]-SST inhibía en mayor medida la secreción de glucagón y GH que de insulina; de igual manera, Meyers *et al*⁵ lo comprobaron con [L-Ala2_D-Cys14]-SST. Dicha selectividad inhibitoria se potenciaba incluso más en el caso de [D-Trp8_D-Cys14]-SST, tanto que incluso se postuló como candidata terapéutica en el tratamiento de diabetes mellitus II.^{4,6}

Sin embargo, no pudieron ser aplicados. Mientras que en los ensayos *in vitro* todos estos derivados tetradecapeptídicos presentaban una semivida plasmática mayor que la SST nativa, seguía siendo insuficiente para una administración *in vivo* debido a que el metabolismo continuaba degradando demasiado rápido dichos compuestos con lo que su eficacia quedaba mermada. No obstante, un nuevo enfoque de síntesis permitió salvar este problema.

² a) B. H. Arison, R. Hirschmann, D. F. Veber, *Bioorg. Chem.* **1978**, *7*, 447-451; b) O. Ovadia, S. Greenberg, B. Laufer, C. Gilon, A. Hoffman, H. Kessler, *Expert Opin. Drug Discov.* **2010**, *5*, 655-671.

³ a) W. Vale, P. Brazeau, C. Rivier, M. Brown, B. Boss, J. Rivier, R. Burqus, N. Ling, R. Guillemin, *Recent Prog. Horm. Res.*, **1975**, *31*, 365-397; b) M. Brown, J. Rivier, W. Vale, *Endocrinology*, **1976**, *98*, 336-343.

⁴ M. Brown, J. Rivier, W. Vale, *Science*, **1977**, *196*, 1467-1469.

⁵ C. Meyers, A. Arimura, A. Gordin, R. Fernández-Durango, D. H. Coy, A. V. Schally, J. Drouin, L. Ferland, M. Beaulie, F. Labrie, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1975**, *65*, 176.

⁶ C. Meyers, A. Arimura, A. Gordin, R. Fernández-Durango, D. H. Coy, A. V. Schally, J. Drouin, L. Ferland, M. Beaulie, F. Labrie, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1977**, *74*, 630-636.

2.2. El *boom* de los octapéptidos.

Al profundizar en la estructura de SST, mediante la eliminación sistemática de residuos, Rivier y colaboradores⁷ llegaron a un péptido activo de menor tamaño capaz de inhibir la liberación de GH, c[Cys_Phe_D-Trp_Lys_Thr_Cys]. Viendo la importancia de la región 6-11 de la SST nativa, crearon una biblioteca de compuestos octa y nonapéptidos los cuales contenían el fragmento Phe_D-Trp_Lys_Thr, siendo esenciales para presentar actividad inhibitoria.⁸

Por ello, se concluyó que el farmacóforo del péptido debía corresponder al espacio ocupado por los cuatro aminoácidos que forman el β -giro, es decir la secuencia Phe₇_Trp₈_Lys₉_Thr₁₀.⁹ Salvo el cambio de isomería del Trp, las posiciones 8 y 9 no aceptan importantes modificaciones sin que se comprometa gravemente la actividad de la molécula resultante. Por el contrario, Phe₇ y Thr₁₀ presentan una mayor flexibilidad en este aspecto.

Se replanteó la síntesis de análogos, respetando el farmacóforo y disminuyendo el tamaño del ciclo, en aras de aumentar su rigidez y por tanto su semivida. Debido a la eficacia del enantiómero D-Trp₈, su incorporación ha sido la norma a lo largo de las últimas décadas.

Bauer *et al*^{9a} continuaron con el trabajo de Rivier. La actividad del péptido c[Cys_Phe_D-Trp_Lys_Thr_Cys] de estos últimos alcanzaba un 0,1% de la actividad *in vitro* que presentaba la somatostatina. Debido a la ausencia de la secuencia Phe₆_Phe₇, decidieron incluir sobre esta secuencia un residuo D-Phe en el extremo N-terminal, para emular la presencia de un anillo aromático que aparece en la hormona natural. Además, añadieron en el extremo C-terminal un

⁷ W. Vale, M. Brown, C. Rivier, M. Perrin, J. Rivier, *Brain Peptides: A New Endocrinology*, **1979**, 71-88.

⁸ W. Vale, C. Rivier, J. Rivier, M. Brown, *Medicinal Chemistry V*, **1977**, 25-62.

⁹ a) W. Bauer, U. Briner, W. Doepfner, R. Halber, R. Huguenin, P. Marbach, T. J. Petcher, J. Pless J. *Life Sci.*, **1982**, *31*, 1133-1140; b) D. Veber, R. Saperstein, R. Nutt, R. Friedinger, S. Brady, P. Curley, D. Perlow, W. Palveda, C. Colton, A. Zacchei, D. Tocco, D. Hoff, R. Vandlen, J. Gerich, L. Hall, L. Mandarino, E. Cordes, P. Anderson, R. Hirschmann, *Life Sci.*, **1984**, *34*, 1371-1378; c) J. E. Taylor, D. H. Coy, *J. Endocrinol. Invest.*, **1997**, *20*, 8-10.

residuo de treonina reducida, emulando a Thr12 en SST: D-Phe_c[Cys_pPhe_DTrp_{Lys}Thr_{Cys}]_{Thr}-ol (figura 2.2). A esta molécula se la denominó SMS 201-995, más conocida por su denominación común internacional (DCI) octreótido, que posteriormente se comercializaría bajo el nombre Sandostatin® por los laboratorios Novartis.

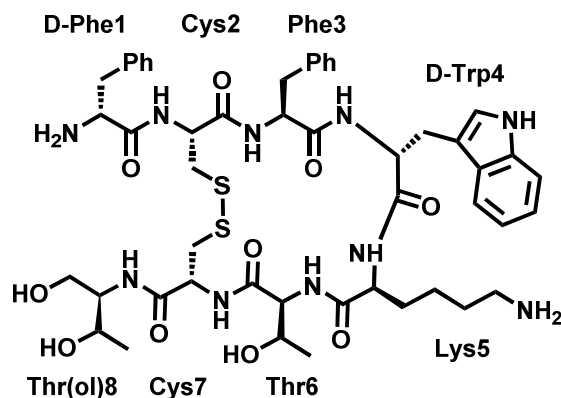


Figura 2.2. Estructura del octreótido.

Este derivado resultó ser más selectivo que la SST, dado que su potencia en la inhibición de la secreción de GH es mayor que para insulina y glucagón. Además, debido a su prolongada semivida (117 minutos¹⁰ frente a 3 minutos de la hormona natural), da como resultado un análogo con más actividad que SST.^{9a} Este elevado tiempo de vida media es consecuencia de la protección de ambos extremos terminales mediante aminoácidos no naturales. Gracias a estas características, el octreótido fue, en 1988, el primer análogo de somatostatina en ser comercializado en el mercado para el tratamiento de la acromegalia y tumores gastrointestinales y pancreáticos.

El potencial demostrado por el octreótido llevó a la búsqueda de nuevos análogos de ocho residuos, usando su estructura como referencia. Schally y colaboradores¹¹ sintetizaron alrededor de doscientos octapéptidos, en alguno de los cuales el par Phe3 – Thr6 fue sustituido por Tyr3 – Val6, “moviendo” el grupo hidroxilo desde la Thr6 (convirtiéndose en Val) a Phe3 (convertida en Tyr).

¹⁰ P. Marbach, U. Briner, M. Lemaire, A. Schweizer, T. Terasaki, *Metab. Clin. Exp.*, **1992**, *41*, 7-10.

¹¹ a) R. Z. Cai, B. Szoke, R. Lu, D. Fu, T.W. Redding, A. V. Schally, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1986**, *83*, 1896-1900; b) R. Z. Cai, T. Karashima, J. Goutch, B. Szoke, D. Olsen, A. V. Schally, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1987**, *84*, 2502-2506.

Además, la pareja de residuos extracíclicos fueron modificados. De toda su colección, destacó su compuesto D-Phe_c[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys]-Trp-NH₂ (código RC-160), de nuevo mucho más selectivo frente a la inhibición de la liberación de GH frente a insulina y glucagón, y ahora también frente a secreción gástrica (figura 2.3). La DCI de este derivado es vapreótido, y también ha llegado a ser comercializado bajo el nombre comercial de Sanvar[®], por la casa comercial Debiopharm Group. Su uso actual incluye el tratamiento de varices esofágicas sangrantes.

Siguiendo esta misma filosofía, y poco tiempo después de los descubrimientos de Schally, Coy y colaboradores¹² sintetizaron el compuesto BIM 23014 de secuencia D-Nal_c[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys]-Thr-NH₂ (figura 2.3), que también resultó ser un excelente análogo en el tratamiento de la acromegalia. Denominado lanreótido, actualmente se comercializa por la compañía farmacéutica francesa Ipsen con el nombre de Somatuline[®].

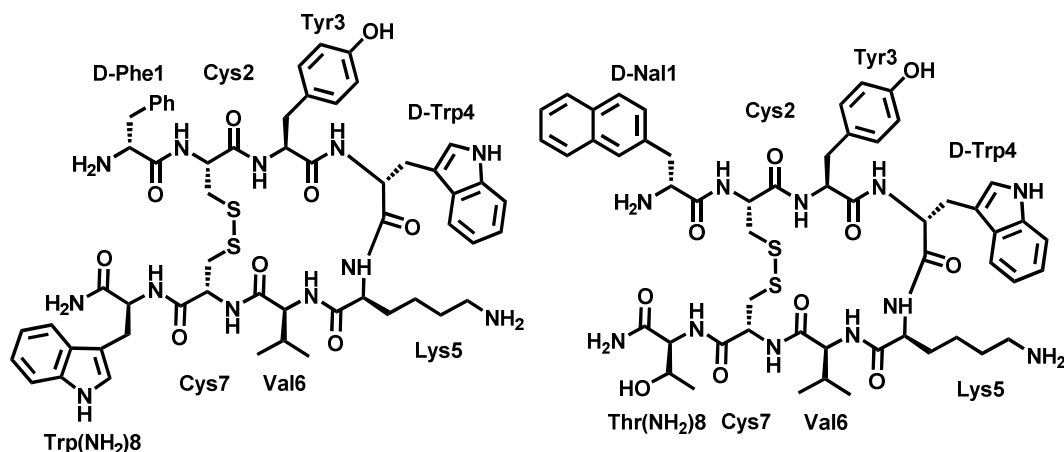


Figura 2.3. Estructura del vapreótido (izquierda) y del lanreótido (derecha), octapéptidos derivados del octreótido.

Paralelamente a estos avances, se fueron describiendo los receptores para SST, referidos como SSTR. Usando diferentes técnicas, se detectaron poblaciones de receptores en distintos órganos, como cerebro, pituitaria, intestino, páncreas endocrino y exocrino, tiroides, riñones, adrenales y células del sistema inmune;

¹² a) W. A. Murphy, V. A. Lance, S. Moreau, J. P. Moreau, D. H. Coy, *Life Sci.*, **1987**, *40*, 2515-2522; b) J. E. Taylor, A. E. Bodgen, J. P. Moreau, D. H. Coy, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1988**, *153*, 81-86; c) K. Raynor, W. Murphy, D. H. Coy, *Mol. Pharmacol.*, **1993**, *43*, 838-844.

no sólo en células sanas, también se expresan en diferentes líneas tumorales.¹³ Hasta la fecha, se han descrito cinco subtipos diferentes de receptores en humanos, también descritos en otras familias de mamíferos, como la murina, la porcina y la bovina.¹⁴ Estos receptores pertenecen a la superfamilia de las proteínas G transmembrana, lo que ha dificultado su caracterización estructural. Este conocimiento hubiese permitido conocer las características de los correspondientes sitios de unión para cada SSTR, con el objeto de racionalizar la síntesis de fármacos específicos. Por ello, el diseño de análogos fue planteado para obtener, de manera indirecta, una relación entre la estructura del péptido y su correspondiente actividad y perfil de afinidad a SSTR.

De los estudios *in vivo* e *in vitro* llevados a cabo, SSTR2 parece ser el receptor principal de esta familia, presentando numerosos efectos inhibitorios sobre la secreción endocrina entre los que destacan los ejercidos en GH, insulina, glucagón, VIP o gastrina, así como sobre secreción exocrina del tracto digestivo. Su presencia es abundante en tumores gastroenteropancreáticos, en procesos de epilepsia y de dolor. SSTR5 estaría más implicado que SSTR2 en la inhibición de liberación de insulina, a la vez que afectaría menos a la liberación de GH. SSTR4

¹³ Revisiones de Y. C. Patel: a) Y. C. Patel, M. T. Greenwood, R. Panetta, L. Demchyshyn, H. Niznik, C. B. Srikant, *Life Sci.*, **1995**, *57*, 1249–1265; b) Y. C. Patel, *J. Endocrinol. Invest.*, **1997**, *20*, 348–367; c) Y. C. Patel, K. K. Murthy, E. Escher, D. Banville, J. Spiess, C. B. Srikant, *Metabolism.*, **1990**, *39*, 63–69; d) Y. C. Patel, C. B. Srikant, *Trends Endocrinol. Metab.*, **1997**, *8*, 398–405; otros autores e) T. Reisine, G. I. Bell, *Endocr. Rev.*, **1995**, *16*, 427–442; f) J. C. Reubi, U. Horisberger, A. Kappeler, J. A. Laissue, *Blood*, **1998**, *92*, 191–197.

¹⁴ a) J. F. Bruno, Y. Xu, J. Song, M. Berelowitz, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1992**, *89*, 11151–11155; b) J. D. Corness, L. L. Demchyshyn, P. Seeman, H. H. M. van Tol, C. B. Srikant, G. Kent, Y. C. Patel, H. B. Niznik, *FEBS Lett.*, **1993**, *321*, 279–284; c) L. L. Demchyshyn, C. B. Srikant, R. K. Sunahara, G. Kent, P. Seeman, H. H. M. van Tol, R. Panetta, Y. C. Patel, H. B. Niznik, *Mol. Pharmacol.*, **1993**, *43*, 894–890; d) X. J. Li, M. Forte, R. A. North, C. A. Ross, S. H. Snyder, *J. Biol. Chem.*, **1992**, *267*, 21307–21312; e) W. Meyerhof, I. Wulfsen, C. Schonrock, S. Fehr, D. Richter, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1992**, *89*, 10267–10271; f) A. M. O'Carroll, S. J. Lolait, M. Konig, L. C. Mahan, *Mol. Pharmacol.*, **1992**, *42*, 939–946; g) R. Panetta, M. T. Greenwood, A. Warszynska, L. L. Demchyshyn, R. Day, H. B. Niznik, C. B. Srikant, Y. C. Patel, *Mol. Pharmacol.*, **1994**, *45*, 417–427; h) L. Rohrer, F. Raulf, C. Bruns, R. Buettner, F. Hofstaedter, R. Schule, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1993**, *90*, 4196–4200; i) Y. Yamada, T. Reisine, S. F. Law, Y. Ihara, A. Kubota, S. Kagimoto, M. Seino, Y. Seino, G. I. Bell, S. Seino, *Mol. Endocrinol.*, **1993**, *6*, 2136–2142; j) K. Yasuda, S. Rens-Domiano, C. D. Breder, S. F. Law, C. B. Saper, T. Reisine, G. I. Bell, *J. Biol. Chem.*, **1992**, *267*, 20422–20428.

afectaría tanto a insulina como a glucagón. El papel de los otros dos subtipos es aún más especulativo, estando SSTR1 relacionado con la visión y SSTR3 con mecanismos de apoptosis celular.¹⁵

Debido a que cada laboratorio diseñó una metodología distinta para medir la afinidad de sus péptidos frente a los SSTR1-5 (usando distintas líneas celulares, diferentes radioligandos y varios protocolos generales), comparar los valores obtenidos para diferentes análogos de diferentes grupos de investigación no resulta trivial, puesto que no están normalizados. Afortunadamente, el grupo de Patel aplicó un mismo procedimiento para los péptidos vistos en esta sección,¹⁶ comparando sus constantes de afinidad con la de los péptidos naturales SST14 y SST28 (tabla 2.1).

	SSTR1 (nM)	SSTR2 (nM)	SSTR3 (nM)	SSTR4 (nM)	SSTR5 (nM)
Somatostatina-14	0,1-2,26	0,2-1,3	0,3-1,6	0,3-1,8	0,2-0,9
Somatostatina-28	0,1-2,20	0,2-4,1	0,3-6,1	0,3-7,9	0,05-0,4
Octreótido	290-1140	0,4-2,1	4,4-34,5	>10 ³	5,6-32
Vapreótido	>10 ³	5,4	31	45	0,7
Lanreótido	500-2330	0,5-1,8	43-107	66-2100	0,6-14

Tabla 2.1. Datos de afinidad expresados en Ki (inhibición frente al desplazamiento de SST marcada radiactivamente) frente a los SSTR1-5 en análogos octapeptídicos destacados frente a la unión de somatostatina tetradecapeptídica y octacosapeptídica, obtenidos por Patel *et al.*¹⁶

La pérdida de afinidad frente a SSTR1 y SSTR4, en menor medida frente a SSTR3, de estos péptidos explicaría el aumento de selectividad en las distintas actividades biológicas. El aumento de la rigidez, la carencia de aminoácidos fuera del farmacóforo (necesitando más aminoácidos que los correspondientes al β -giro Phe_D-Trp_Lys_Thr) o una combinación de ambos factores podrían justificar esta discriminación entre receptores.

Por tanto, estos datos no arrojan mucha luz sobre una posible relación estructura-actividad. Sin embargo, apuntan en una dirección clave, que es en la

¹⁵ a) A. Vezzani, D. Hoyer, *Eur. J. Neurosci.*, **1999**, *11*, 3767-3776; b) G. Weckbecker, I. Lewis, R. Albert, H. A. Schmid, D. Hoyer, C. Bruns, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2003**, *2*, 999-1017; c) A. Rubio, J. Ávila, L. de Lecea, *Expert Opin. Ther. Targets*, **2007**, *11*, 1-9.

¹⁶ Y. C. Patel, C. B. Srikant, *Endocrinology*, **1994**, *135*, 2814-2817.

necesaria cercanía que han de tener dos residuos, Phe6 y Phe11, emulado en los octapéptidos por un puente disulfuro, para que la molécula tenga un perfil de actividad adecuado sobre SSTR2.

Hasta la fecha, la mayoría de investigaciones en somatostatina se han enfocado en derivados octapéptidos (y también hexapéptidos), así como su estudio del perfil farmacológico enfocado hacia la selectividad y potencia frente a SSTR2, siendo minoritario el enfoque hacia análogos que contengan catorce residuos.

2.3. El efecto de las interacciones aromáticas.

Las interacciones aromáticas son ubicuas tanto en procesos biológicos como químicos. Mediante ellas se estabilizan las dobles hélices del ADN,¹⁷ garantizan la estabilidad térmica de proteínas termófilas,¹⁸ provocan la agregación de β -amiloide en la enfermedad de Alzheimer,¹⁹ y participan en sistemas de reconocimiento invasor-hospedador de virus,²⁰ entre otras. La presencia de estructuras secundarias y terciarias en proteínas se ve tanto favorecida como estabilizada por la presencia de interacciones aromáticas: alrededor del 60% de los anillos aromáticos presentes en una proteína actúan en pares aromáticos, y el 80% de estos pares contribuyen a estabilizar estructuras terciarias mediante el acercamiento de elementos de estructuras secundarias.²¹ Energéticamente, una interacción aromática presenta una energía media de entre -1,0 y -2,0 kcal/mol, y estabiliza la proteína en una contribución de -0,6 y -1,3 kcal/mol.²²

¹⁷ E. T. Kool, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 2001, **30**, 1-22.

¹⁸ N. Kannan, S. Vishveshwara, *Protein. Eng.*, 2000, **13**, 753-761.

¹⁹ E. Gazit, *FASEB J.*, 2002, **16**, 77-83.

²⁰ C. A. Hunter, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1991**, 749-751.

²¹ a) S. K. Burley, G. A. Petsko, *Science*, **1985**, 229, 23-28; b) T. Blundell, J. Singh, J. Thornton, S. K. Burley, G. A. Petsko, *Science*, **1986**, 234, 1005-1005; c) J. Singh, J. M. Thornton, *FEBS Lett.*, **1985**, 191, 1-6.

²² L. Serrano, M. Bycroft, A. R. Fersht, *J. Mol. Biol.*, **1991**, 218, 465-475.

La línea de pensamiento actual apunta hacia que las interacciones aromáticas son producidas por fuerzas de van der Waals, electrostáticas e hidrofóbicas, aunque la magnitud e importancia relativa de cada una de ellas no se ha podido determinar con precisión.²³ Aun así, ha sido demostrado que a causa de efectos electrostáticos e hidrofóbicos, la interacción aromática queda potenciada en medio acuoso.²⁴ Dato importante dado que es el medio donde se estudian dichas interacciones en proteínas.

Debido a los componentes electrostáticos de los anillos, se han propuesto distintas geometrías para las interacciones aromáticas según sus momentos cuadrupolares, usando como modelos anillos simples de benceno y perfluorobenceno (figura 2.4).²⁵

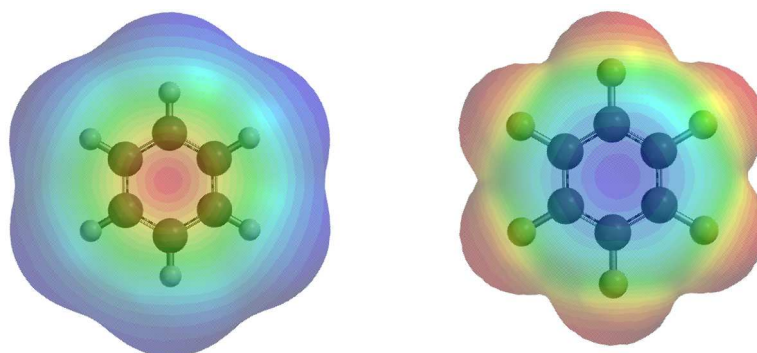


Figura 2.4. Densidades electrónicas de los dos anillos aromáticos benceno (izquierda) y perfluorobenceno (derecha). Cálculo en Spartan (semi-empírico AM1).²⁶ Azul = densidad electrónica baja. Rojo = densidad electrónica alta.

El momento dipolar del benceno es nulo, pero la distribución de cargas no es homogénea: debido a que la electronegatividad del carbono es superior a la del hidrógeno, el enlace queda polarizado en dirección al primero, que junto a los electrones que forman los enlaces π carbono-carbono permiten la creación de una nube de elevada densidad electrónica en ambas caras del anillo, y muy disminuida en la periferia donde se encuentran los átomos de hidrógeno. La situación contraria vendría definida por el perfluorobenceno, donde el enlace C-

²³ C. A. Hunter, K. R. Lawson, J. Perkins, C. J. Urch, *J. Chem. Soc. Perkin. Trans.*, **2001**, 5, 651-669.

²⁴ M. D. Sindkhedkar, H. R. Mulla, A. Cammers-Goodwin, *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, 122, 9271-9277.

²⁵ C. A. Hunter, J. K. M. Sanders, *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, 112, 5525-5534.

²⁶ Spartan '10 v. 1.1.0 (Wavefunction).

F quedaría polarizado hacia el flúor, dando una elevada densidad electrónica en la periferia del anillo y empobreciendo la densidad de la nube anular π . De esta forma, los momentos cuadrupolares de ambos quedan invertidos.

En estado sólido, las moléculas de benceno se ordenan en una formación *edge-to-face*, en una interacción CH - nube π . Este tipo de interacción es frecuente en proteínas. Cuando uno de los anillos del par aromático tiene disminuida su densidad electrónica anular, es frecuente el tipo de interacción *offset-stacked*, más propia del ADN, en donde las fuerzas de van der Waals e hidrófobas se incrementan al tener una mayor proporción de superficie cubierta que en la interacción *edge-to-face*. Cuando uno de los anillos presenta una densidad electrónica muy inferior, como en un par perfluorobenceno-benceno, se produce una relación atractiva entre ambas caras, permitiendo un acercamiento *face-to-face*. Esta última interacción se encuentra desfavorecida en el par benceno-benceno, debido a una polaridad similar (ver figura 2.5).

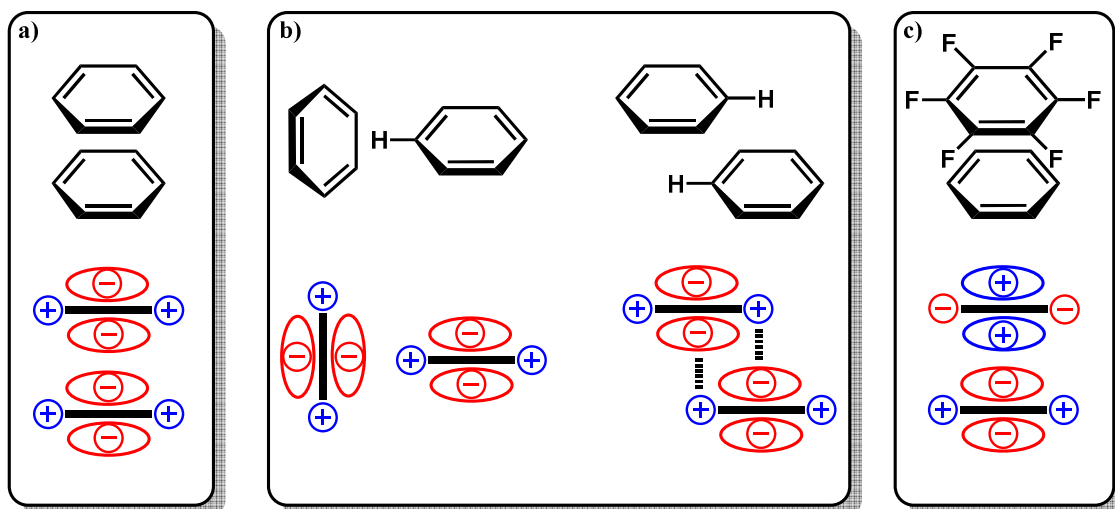


Figura 2.5. Interacciones entre anillos aromáticos. **a:** dos anillos ricos en electrones encontrarán desfavorecida una interacción *face-to-face*, al tener sus respectivas densidades electrónicas cercanas. **b:** debido al carácter cuadrupolar de los anillos aromáticos, las interacciones de tipo *edge-to-face* (izquierda) y *offset-stacked* (derecha) son frecuentes en anillos ricos en electrones. **c:** al enfrentarse un anillo rico en electrones como el benceno a un anillo pobre en electrones como el perfluorobenceno, la interacción de tipo *face-to-face* resulta favorable.

El potencial de las interacciones aromáticas ha sido estudiado en múltiples contextos, como materiales,²⁷ catálisis asimétrica,²⁸ química supramolecular²⁹ y sistemas biológicos.³⁰ Se ha descubierto que, en proteínas en disolución acuosa, dos fenilalaninas en posiciones i e $i+3/i+4$ estabilizan la formación de una hélice α en $-3,3$ KJ/mol.³¹ Estudios llevados a cabo por Tatko y Waters³² demostraron la aptitud de la fenilalanina para llevar a cabo una autoasociación que estabilizaba la formación de láminas β en péptidos modelo.

Incluso en los primeros ensayos con derivados de somatostatina se demostró el potencial que las interacciones aromáticas entre Phe6, Phe7 y Phe11 podrían tener: la dihidrosomatostatina (H₂-SST, con ambas cisteínas reducidas) presenta la misma capacidad que la hormona nativa *in vitro* para inhibir la liberación de insulina y glucagón inducida por arginina.³ Aunque la hormona aumente su flexibilidad conformacional al perder su carácter cíclico, se postuló que el trío de aminoácidos aromáticos serían claves para estabilizar estructuralmente al péptido.³³ Debido a la retención de actividad biológica en SSTR2 al ser sustituidas las fenilalaninas 6 y 11 por un puente disulfuro de cisteínas, se sugirió que ambos anillos aromáticos formarían una interacción de tipo aromática en algunas de las posibles conformaciones tridimensionales en disolución.³⁴ Estas suposiciones se sustentaban en distintos estudios hechos por RMN, que sugerían un acercamiento perpendicular entre Phe6 y Phe11, debido

²⁷ G. W. Coates, A. R. Dunn, L. M. Henling, D. A. Dougherty, R. H. Grubbs, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1997**, *36*, 248-251.

²⁸ a) H. C. Kolb, P. G. Andersson, K. B. Sharpless, *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, *116*, 1278-1291; b) M. Yamakawa, I. Yamada, R. Noyori, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2001**, *40*, 2818-2821.

²⁹ R. A. Bissell, E. Cordova, A. E. Kaifer, J. F. Stoddart, *Nature*, **1994**, *369*, 133-137.

³⁰ R. Faraoni, R. K. Castellano, V. Gramlich, F. Diederich, *Chem. Commun.* **2004**, *4*, 370-371.

³¹ S. M. Butterfield, P. R. Patel, M. L. Waters, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *124*, 9751-9755

³² C. D. Tatko, M. L. Waters, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *124*, 9372-9373.

³³ a) J. E. Rivier, M. R. Brown, W. W. Vale, *J. Med. Chem.*, **1976**, *19*, 1010-1013; b) D. F. Veber, F. W. Holly, W. J. Paleveda, R. F. Nutt, S. J. Bergstrand, M. Torchiana, M. S. Glitzer, R. Saperstein, R. Hirschmann, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1978**, *75*, 2636-2640.

³⁴ M. Knappenberg, A. Michel, A. Scarso, J. Brison, J. Zanen, K. Hallenga, P. Deschrijver, G. Van Binst, *Biochim. Biophys. Acta, Protein Struct. Mol. Enzymol.*, **1982**, *700*, 229-246.

al apantallamiento que sufrían los H δ y H ϵ del primero.³⁵ Estudios posteriores propusieron una interacción entre Phe6 con Phe7 como mayoritaria;³⁶ los estudios bidimensionales NOESY de SST no mostraban NOEs entre protones aromáticos de los residuos 6 y 11, por lo tanto esta interacción no estaría presente en las conformaciones mayoritarias de la hormona en disolución.

Ni la hipótesis de interacción Phe6-Phe11 ni la de Phe6-Phe7 pudieron ser definitivamente probadas o refutadas. Debido a la alta flexibilidad de la hormona nativa no ha sido posible, hasta la fecha, obtener su estructura tridimensional mediante espectroscopía de RMN o datos de rayos X.

2.4. Estudios previos en somatostatina en nuestro grupo de investigación.

La empresa BCN Peptides S.A. se fundó en el año 1989, con el objetivo de convertirse en una empresa de referencia en la distribución de péptidos con uso médico, así como ofrecer sus servicios para diseñar y sintetizar péptidos específicos a demanda de los clientes. Debido al potencial uso de la somatostatina como fármaco y usos en investigación, diseñaron un método de obtención de esta hormona, patentado en 1999.

Al mismo tiempo, nuestro grupo de investigación se encontraba cada vez más especializado en síntesis asimétrica de diferentes productos, entre ellos aminoácidos no naturales. Aprovechando estos conocimientos, junto a la eficaz metodología de síntesis de péptidos en BCN Peptides S.A., se inició una colaboración con la que se pretendía aumentar el conocimiento disponible de la SST, mediante el uso de análogos que incluyesen en su estructura aminoácidos no naturales pero, sobre todo, que mantuviesen la estructura tetradecapeptídica.

³⁵ a) B. H. Arison, R. Hirschmann, W. J. Paleveda, S. F. Brady, D. F. Veber, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1981**, 100, 1148-115; b) J. D. Cutnell, G. N. La Mar, J. L. Dallas, P. Hug, H. Ring, G. Rist, *Biochim. Biophys. Acta, Protein Struct. Mol. Enzymol.*, **1982**, 700, 59-66.

³⁶ a) A. W. H. Jans, K. Hallenga, G. Van Binst, A. Michel, A. Scarso, J. Zanen, *Biochim. Biophys. Acta, Protein Struct. Mol. Enzymol.*, **1985**, 827, 447-452. b) E. M. M. Van den Berg, A. W. H. Jans, G. Van Binst, *Biopolymers*, **1986**, 25, 1895-1908.

Los primeros avances en este sentido fueron desarrollados por la Dra. Rosario Ramón. En su tesis doctoral³⁷ se diseñó la ruta sintética de dos aminoácidos no naturales: L- y D-3-(3'-quinolil)-alanina (también conocido por sus siglas Qla) y L-alilglicina (alilGly).

L- y D-Qla son análogos de L- y D-Trp respectivamente. De un tamaño similar, sin embargo las propiedades electrónicas son drásticamente diferentes: mientras que el indol del triptófano es rico en electrones gracias al anillo de pirrol (dándole un carácter dador), el anillo piridínico de la quinolina crea un par de anillos aromáticos de baja densidad electrónica (aceptor). Además, se encuentra ausente el enlace N-H (figura 2.6).

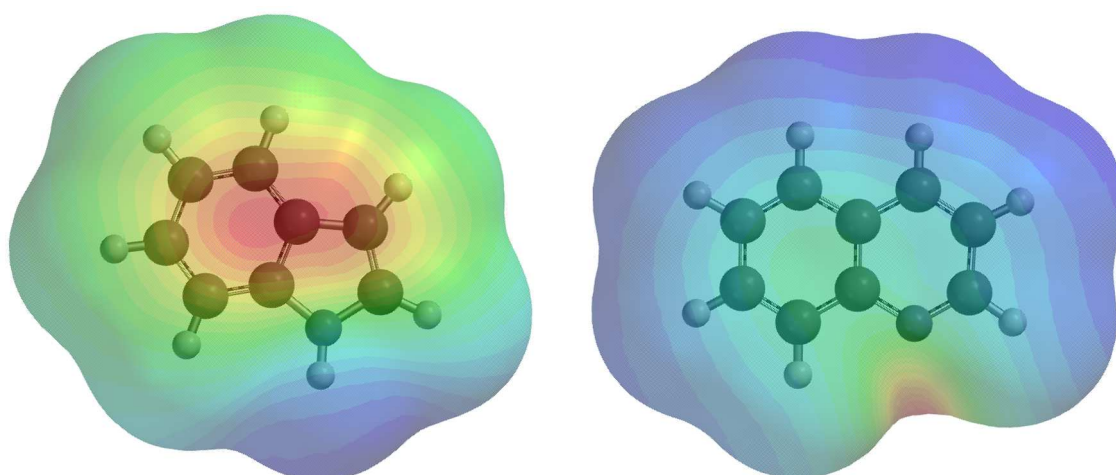


Figura 2.6. Densidades electrónicas de los anillos aromáticos del indol (izquierda) y de la quinolina (derecha). Cálculo en Spartan (semi-empírico AM1).²⁶ Azul = densidad electrónica baja. Rojo = densidad electrónica alta.

Por esta razón, se sintetizaron el par de análogos tetradecapéptidos que sustituyen el Trp8 por Qla8 (usando ambos isómeros L y D), con el fin de determinar si la variación en la densidad electrónica del aminoácido clave 8 provocaba cambios sustanciales en la rigidez de la molécula, y al mismo tiempo determinar la modificación en el perfil farmacológico que pudiera producirse (figura 2.7).

³⁷ R. Ramón, tesis doctoral *Síntesis de aminoácidos no naturales y aplicación a la síntesis de péptidos con interés farmacológico*, Universidad de Barcelona, 2009.

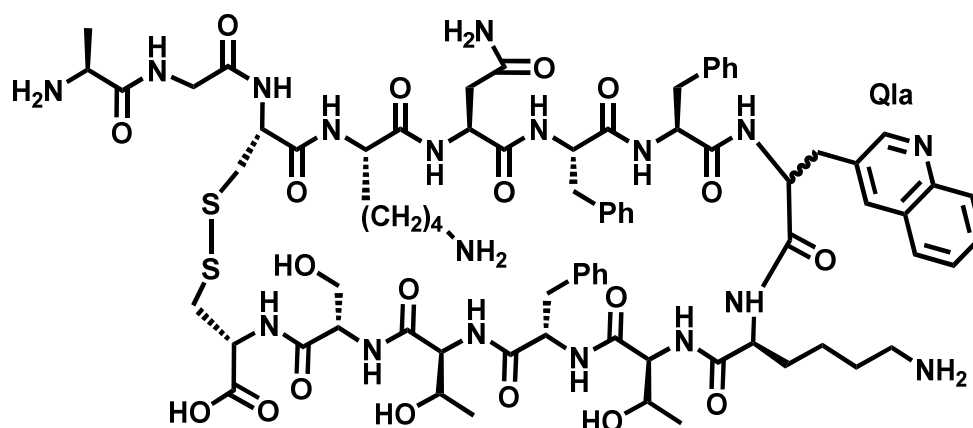


Figura 2.7. Estructura de [L-Qla8]-SST y [D-Qla8]-SST, ambos sustituyendo al L-Trp8 de la secuencia nativa.

Los análisis por RMN demostraron que estas nuevas especies presentaban mayor flexibilidad conformacional, interpretado desde la menor densidad de señales NOE en espectros bidimensionales. Se postuló que la falta del protón indólico N-H podría explicar esta pérdida de rigidez conformacional, dada su capacidad de generar interacciones con residuos vecinos; además, se tradujo en un perfil farmacológico frente a SSTR diferente al de SST14 (tabla 2.2).

	SSTR1 (nM)	SSTR2 (nM)	SSTR3 (nM)	SSTR4 (nM)	SSTR5 (nM)
Somatostatina-14	0,43	0,0016	0,53	0,74	0,23
[D-Trp8]-SST	0,32	0,0010	0,61	5,83	0,46
Octreótido	300	0,053	15,2	>10 ³	11,53
[L-Qla8]-SST	1,33	>10 ³	1,95	>10 ³	>10 ³
[D-Qla8]-SST	13,66	1,16	0,65	>10 ³	14,52

Tabla 2.2. Datos de afinidad frente a los SSTR1-5 de los análogos Qla8 frente a compuestos de referencia, obtenidos en colaboración entre nuestro grupo y BCN Peptides S.A.³⁸

Tanto [L-Qla8]-SST como [D-Qla8]-SST tienen un perfil de actividad cercano al de SST14 en SSTR3 y, mientras que con el isómero L se obtienen unos perfiles de unión a SSTR1 parecidos a la del péptido nativo, con el isómero D se llega a valores de K_i en el rango del octreótido para SSTR5. Esto implica que una disminución en la rigidez de la estructura, además de la modificación del

³⁸ R. Ramón, P. Martín-Gago, X. Verdaguer, M. J. Macías, P. Martín-Malpartida, J. Fernández-Carneado, M. Gómez-Caminals, B. Ponsati, P. López-Ruiz, M. A. Cortés, B. Colás, A. Riera, *ChemBioChem*, **2011**, *12*, 625-632

aminoácido clave D-Trp, puede traducirse en un aumento de la selectividad entre los distintos subtipos de SSTR, además de mantener el perfil de actividad en alguno de ellos. Estos resultados fueron publicados en el año 2011.³⁸

En su misma tesis doctoral, fue llevada a cabo la ciclación de somatostatina mediante *Ring-Closing Metathesis* (RCM).³⁹ El puente disulfuro aparece en muchas proteínas presentando un papel estructural, al mantener las organizaciones secundarias y terciarias en dichas moléculas.⁴⁰ Por ello, su papel biológico es indirecto, al asegurar un esqueleto tridimensional funcional. Debido a la sensibilidad de los puentes disulfuros a la acción enzimática de reductasas⁴¹ y a su labilidad frente a condiciones básicas/nucleófilas,⁴² la modificación de este tipo de enlace es un objetivo en la síntesis de derivados de péptidos.

Hay distintos ejemplos en la literatura donde el puente disulfuro es sustituido por análogos, usando como molécula base el octreótido. Veber *et al.*⁴³ dispusieron del ácido 2,7-diaminosubérico como puente entre ambos extremos del ciclo, así como Gazal *et al.*⁴⁴ aprovecharon aminoácidos bifuncionales para ciclar la cadena de aminoácidos.

Además, el grupo de investigación de Ginnanneschi⁴⁵ sustituyó en la secuencia del octreótido ambas cisteínas por L-alilglicinas, mediante una reacción de metátesis en fase sólida. Este derivado presentaba una conformación

³⁹ a) R. H. Grubbs, S. J. Millar, G. C. Fu, *Acc. Chem. Res.*, **1995**, *28*, 446-552; b) M. Schuster, S. Blechert, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1997**, *36*, 2036-2056; c) R. H. Grubbs, S. Chang, *Tetrahedron*, **1998**, *54*, 4413-4450; d) S. J. Connon, S. Blechert, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2003**, *42*, 1900-1923; e) R. H. Grubbs, *Tetrahedron*, **2004**, *60*, 7117-7140.

⁴⁰ P. Grieco, P. Campiglia, I. Gómez-Monterrey, T. Lama, E. Novellino, *Synlett*, **2003**, *14*, 2216-2218.

⁴¹ *Reviews* al respecto: a) O. W. Griffith, *Methods Enzymol.*, **1987**, *143*, 366-376; b) A. Rietsch, J. Beckwith, *Annu. Rev. Genet.*, **1998**, *32*, 163-184.

⁴² J. L. Kice, *Acc. Chem. Res.*, **1968**, *1*, 58-64 y posteriores.

⁴³ D. F. Veber, R. G. Strachan, S. J. Bergstrand, F. W. Holly, C. F. Homnick, R. Hirschmann, M. L. Torchiana, R. Saperstein, *J. Am. Chem. Soc.*, **1976**, *98*, 2367-2369.

⁴⁴ S. Gazal, G. Gelerman, O. Ziv, O. Karpov, P. Litman, M. Bracha, M. Afargan, C. Gilon, *J. Med. Chem.*, **2002**, *45*, 1665-1671.

⁴⁵ A. Carotenuto, D. D'Addona, E. Rivalta, M. Chelli, A. M. Papini, P. Rovero, M. Ginnanneschi, *Lett. Org. Chem.*, **2005**, *2*, 274-279.

tridimensional parecida al octreótido, contando con una estabilidad en suero mayor. Robinson y Jackson⁴⁶ continuaron con esta línea, describiendo una metodología de obtención de análogos dicarbáclicos por metátesis asistida por microondas, la cual reduce el tiempo de reacción considerablemente.

Usando este procedimiento, fue sintetizado el análogo de catorce residuos [L-alilGly3,14]-SST (figura 2.8), finalizando su síntesis con RCM asistida por microondas. Así, las alilglicinas forman un puente C=C de la misma longitud atómica que el ofrecido por dos cisteínas, aunque la geometría *cis* del doble enlace resultante haga variar los ángulos diedros de los enlaces amida correspondientes.

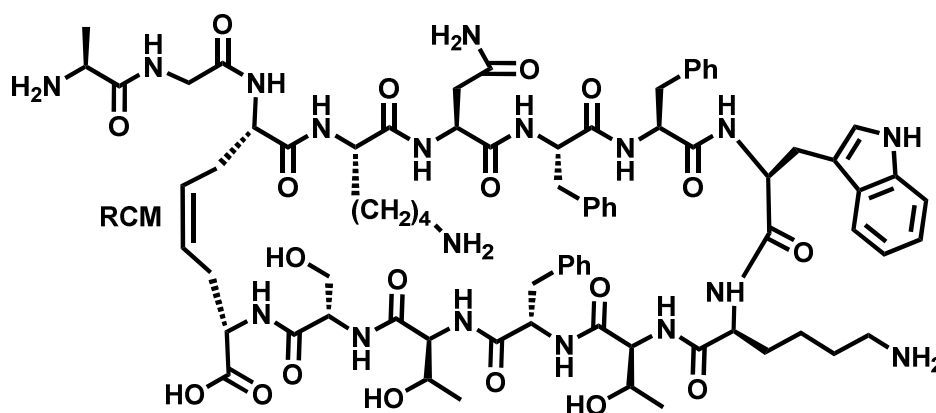


Figura 2.8. Estructura de [L-alilGly3,14]-SST, formando un puente HC=CH que cierra el ciclo.

Como en los casos anteriores, la rigidez conformacional disminuye, según lo que se detecta mediante espectros NOESY bidimensionales. Y aun siendo estructuralmente similar a la SST14 nativa, [L-alilGly3,14]-SST pierde la afinidad por SSTR2-4 (más por SSTR2), mientras la mantiene para SSTR1 y 5 (tabla 2.3).

	SSTR1 (nM)	SSTR2 (nM)	SSTR3 (nM)	SSTR4 (nM)	SSTR5 (nM)
Somatostatina-14	0,43	0,0016	0,53	0,74	0,23
[D-Trp8]-SST	0,32	0,0010	0,61	5,83	0,46
Octreótido	300	0,053	15,2	>10 ³	11,53
[L-alilGly3,14]-SST	0,31	0,41	4,24	1,77	0,20

Tabla 2.3. Datos de afinidad frente a los SSTR1-5 del dicarba-análogo frente a compuestos de referencia, obtenidos en colaboración entre nuestro grupo y BCN Peptides S.A.⁴⁷

⁴⁶ a) A. N. Whelan, J. Elaridi, M. Harte, S. V. Smith, W. R. Jackson, A. J. Robinson, *Tetrahedron Lett.*, **2004**, *45*, 9545-9547; b) A. N. Whelan, J. Elaridi, R. J. Mulder, A. J. Robinson, W. R. Jackson, *Can. J. Chem.*, **2005**, *83*, 875-881; c) A. J. Robinson, J. Elaridi, B. J. van Lierop, S. Mujcinovic, W. R. Jackson, *J. Pept. Sci.*, **2007**, *13*, 280-285.

Puede que la modificación de los ángulos diedros sufrida en la región cercana al doble enlace altere las posiciones relativas de aminoácidos distales, de tal forma que afecte a la afinidad con SSTR2. Sin embargo, el hecho de que mantenga tan buenos K_i sobre el resto de receptores abre una puerta a la modificación del enlace -S-S- para así aumentar el tiempo de vida medio plasmático de los derivados tetradecapeptídicos. Estos resultados fueron publicados en el año 2014.⁴⁷

En su búsqueda por encontrar análogos de mayor selectividad y estabilidad la empresa BCN Peptides S.A. incluyó el aminoácido mesitilalanina en la secuencia de SST14. A consecuencia de los tres metilos aumenta el tamaño del anillo, lo que se traduce en un mayor impedimento estérico al que se somete el entorno de la posición del aminoácido dentro del péptido. Además, este aminoácido no natural, debido al efecto electrón-dador de los grupos metilos, tiene una nube electrónica π en el anillo de mayor densidad que la L-fenilalanina (figura 2.9). Recordando la información analizada en la sección 2.3 de este capítulo, potenciaría el efecto de las interacciones aromáticas.

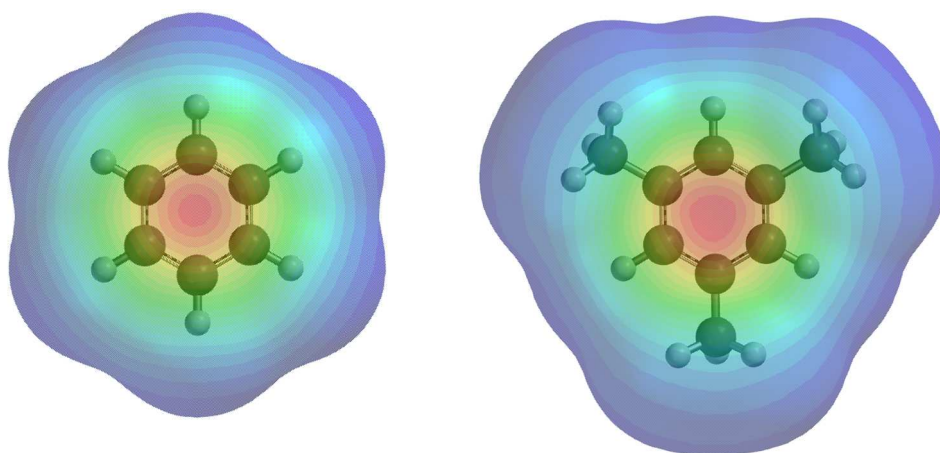


Figura 2.9. Densidades electrónicas de los anillos aromáticos del benceno (izquierda) y del mesitileno (derecha). Cálculo en Spartan (semi-empírico AM1).²⁶ Azul = densidad electrónica baja. Rojo = densidad electrónica alta.

⁴⁷ P. Martín-Gago, R. Ramón, E. Aragón, J. Fernández-Carneado, P. Martín-Malpartida, X. Verdager, P. López-Ruiz, B. Colás, M. A. Cortés, B. Ponsati, M. J. Macías, A. Riera, *Bioorg. & Med. Chem. Lett.*, **2014**, *24*, 103-107.

Por esa razón, se continuó la colaboración con la compañía BCN Peptides S.A., por lo cual Pablo Antonio Martín-Gago, en su tesis doctoral, inició en nuestro grupo el desarrollo de un trabajo de investigación de análogos de somatostatina de catorce residuos que incluyesen en su estructura L-mesitilalanina, además del aminoácido D-triptófano en posición 8.⁴⁸

Los tres péptidos sintetizados siguiendo este planteamiento, [L-Msa6_D-Trp8]-SST, [L-Msa7_D-Trp8]-SST y [L-Msa11_D-Trp8]-SST, presentaron un nivel de ordenamiento estructural muy elevado, restringiendo su posición tridimensional a una única conformación en cada caso. Era de esperar que los nueve protones metílicos en el anillo de mesitilo, junto a sus protones aromáticos muy apantallados, permitieran obtener información adicional de contactos entre aminoácidos al analizar los espectros bidimensionales NOESY y TOCSY. Además de que resultó cierto, estos péptidos presentaron una elevada densidad de señales NOE en sus respectivos espectros, indicativo de una alta ordenación.

El péptido [L-Msa6_D-Trp8]-SST (figura 2.10) crea un clúster aromático en el que participan los tres anillos de Msa6, Phe7 y Phe11, orientados los tres hacia una de las caras de la molécula.

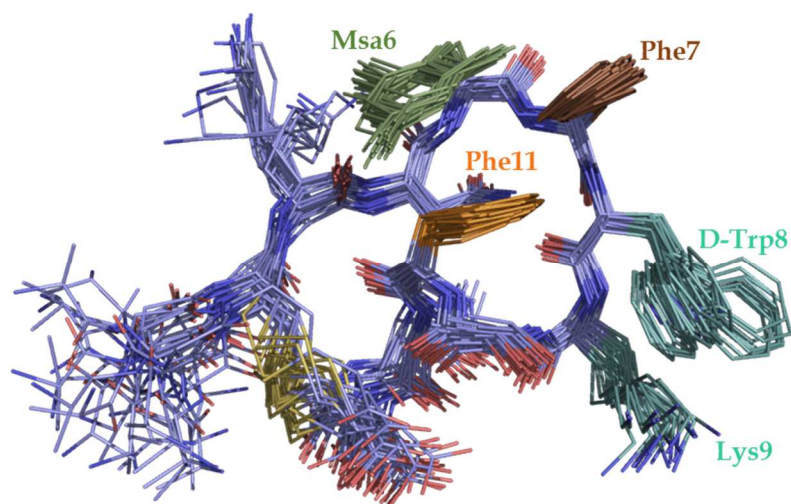


Figura 2.10. Estructura tridimensional de [L-Msa6_D-Trp8]-SST, con una aproximación entre Msa6, Phe7 y Phe11 formando un clúster de anillos aromáticos, obtenida mediante RMN.

⁴⁸ P. A. Martín-Gago, tesis doctoral *Synthesis of highly structured and receptor-selective tetradecapeptidic analogs of somatostatin: Fine-tuning the non-covalent interactions among their aromatic residues*, Universidad de Barcelona, 2013.

De los tres aminoácidos aromáticos, Msa6 y Phe11 son los que más próximos se encuentran, con una fuerte interacción *face-to-face*. A su vez, el par D-Trp8 y Lys9 se orientan hacia la misma cara del péptido que el clúster.

En el péptido [L-Msa7_D-Trp8]-SST (figura 2.11), la Msa7 potencia el efecto de la interacción aromática Phe6-Phe11 de manera indirecta; al situarse plana en la cara contraria de la molécula en donde se encuentran ambos residuos de fenilalanina, posiblemente facilite dicho acercamiento. En este caso, el tipo de interacción que definen al dúo aromático es de geometría *edge-to-face*. El par D-Trp8_Lys9 se orienta hacia el exterior del esqueleto peptídico.

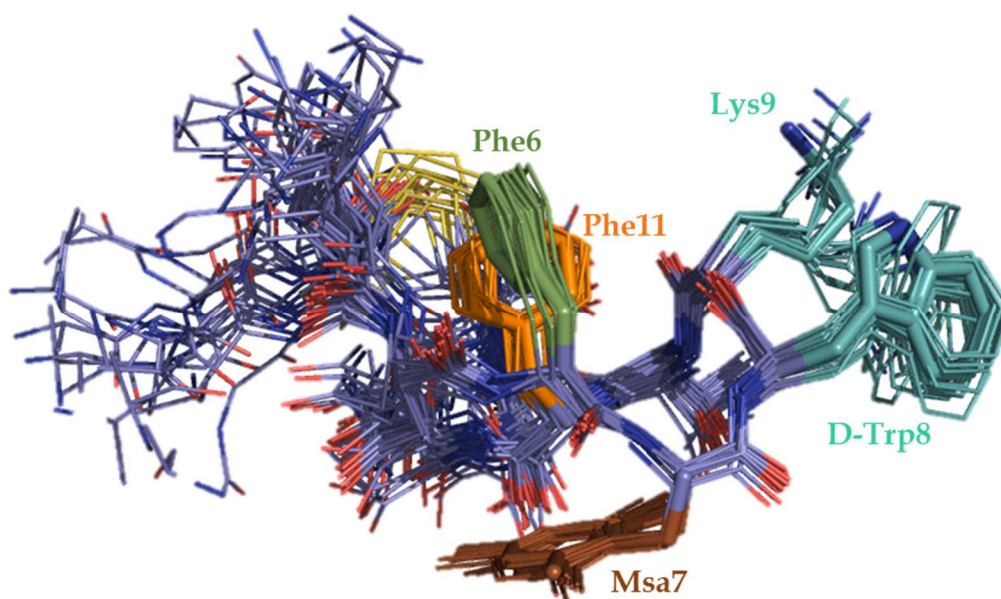


Figura 2.11. Estructura tridimensional de [L-Msa7_D-Trp8]-SST, con una aproximación entre Phe6 y Phe11 *edge-to-face*, obtenida mediante RMN.

El péptido [L-Msa11_D-Trp8]-SST (figura 2.12) acerca las caras π de los residuos aromáticos 6 y 11 (geometría *face-to-face*), mientras Phe7 se coloca en la cara contraria del derivado, cercano espacialmente a Asn5, Thr10 y Thr12. Como consecuencia de la ausencia de señales NOE entre el par D-Trp8_Lys9 y el resto de la molécula, ambos residuos se orientan en una posición distal respecto a los otros aminoácidos, como ocurre en [L-Msa7_D-Trp8]-SST.

Al obtenerse unas estructuras bien definidas tridimensionalmente, la información del perfil de afinidad de estos derivados cobra especial importancia, al poder establecer una correlación entre conformación y actividad sobre SSTR.

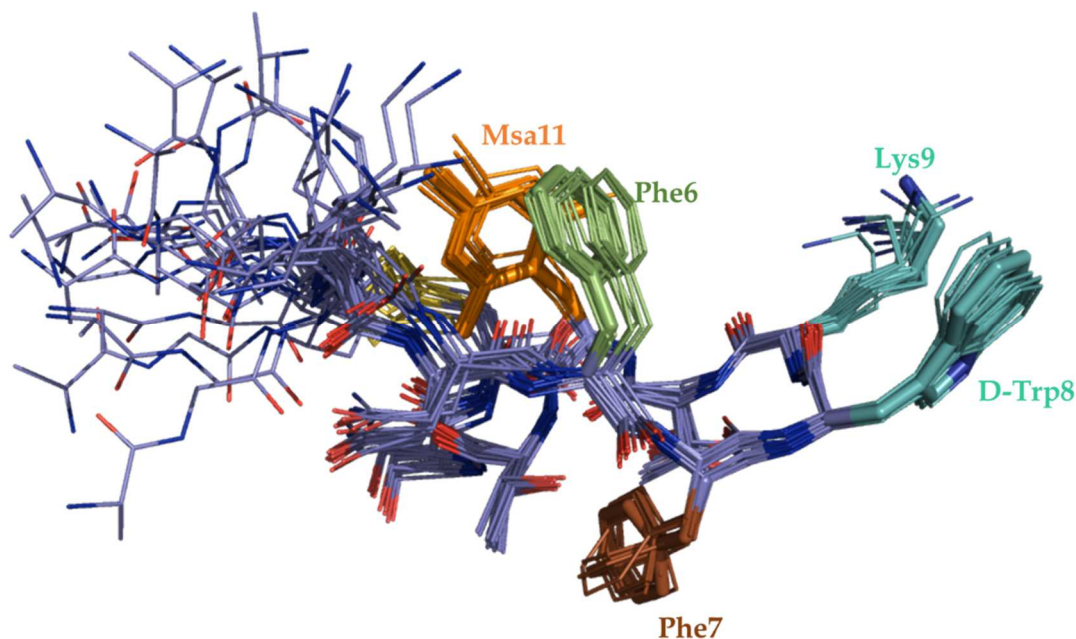


Figura 2.12. Estructura tridimensional de [L-Msa11_D-Trp8]-SST, con una aproximación entre Phe6 y Msa11 *face-to-face*, obtenida a partir de experimentos 2D espectroscópicos.

Analizando los resultados reflejados en la tabla 2.4, se observa que el péptido [L-Msa6_D-Trp8]-SST mantiene el mismo rango de actividad sobre SSTR3 y SSTR5 que SST14, mientras que lo pierde en SSTR2. Esto contradice la hipótesis planteada por Hirschmann,⁴⁹ que suponía que el anillo fenilo de la Phe6 interactúa con el SSTR2 mediante una donación de densidad π .

	SSTR1 (nM)	SSTR2 (nM)	SSTR3 (nM)	SSTR4 (nM)	SSTR5 (nM)
Somatostatina-14	0,43	0,0016	0,53	0,74	0,23
[D-Trp8]-SST	0,32	0,0010	0,61	5,83	0,46
Octreótido	300	0,053	15,2	>10 ³	11,53
[L-Msa6_D-Trp8]-SST	3,08	4,55	0,78	4,70	0,36
[L-Msa7_D-Trp8]-SST	0,33	0,0024	7,49	>10 ³	>10 ³
[L-Msa11_D-Trp8]-SST	3,35	0,14	1,31	>10 ³	0,73

Tabla 2.4. Datos de afinidad frente a los SSTR1-5 de los análogos Msa frente a compuestos de referencia, obtenidos en colaboración entre nuestro grupo y BCN Peptides S.A.⁵⁰

⁴⁹ S. Neelamkavil, B. Arison, E. Birzin, J. Feng, K. Chen, A. Lin, F. Cheng, L. Taylor, E. R. Thornton, A. B. Smith III, R. Hirschmann *J. Med. Chem.*, **2005**, *48*, 4025-4030.

⁵⁰ P. Martín-Gago, M. Gómez-Caminals, R. Ramón, X. Verdaguer, P. Martín-Malpartida, E. Aragón, J. Fernández-Carneado, B. Ponsati, P. López-Ruiz, M. A. Cortés, B. Colás, M. J. Macías, A. Riera, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2012**, *51*, 1820-1825.

[L-Msa7_D-Trp8]-SST, con una afinidad de orden picomolar hacia el receptor SSTR2, supera al octreótido en potencia hacia este subtipo. Además, iguala a somatostatina en su unión con SSTR1, empeora en SSTR3 y pierde completamente su actividad sobre SSTR4 y 5. De acuerdo con el farmacóforo propuesto por Kaupmann⁵¹ para SSTR1, la afinidad de [L-Msa7_D-Trp8]-SST con este subreceptor se vería incrementada gracias a una interacción π - π entre Msa7 y Phe195 del SSTR1.

La unión de [L-Msa11_D-Trp8]-SST está enfocada principalmente hacia SSTR5, y en menor medida hacia SSTR1, SSTR2 y SSTR3, lo que no lo hace muy selectivo. Como [L-Msa7_D-Trp8]-SST, pierde completamente la afinidad hacia SSTR4, lo que plantea que una restricción de la conformación orientando los residuos 6 y 11 hacia una cara del péptido y el residuo 7 hacia la contraria, provoque una disminución en la unión con este receptor.

Estos prometedores resultados, publicados en 2012,⁵⁰ abrían una nueva puerta y ofrecían una nueva herramienta en el estudio de análogos de somatostatina de catorce residuos, dado que por vez primera se obtenían unas estructuras bien definidas en disolución que, además, permitían establecer patrones en su actividad con los SSTR1-5. Por ello, en esta tesis doctoral se pretende continuar profundizando en su conocimiento, en los factores que afectan a su perfil de unión a receptores y a la aproximación indirecta de las conformaciones mayoritarias que puebla, en disolución, esta hormona de actividad biológica inhibitoria.

⁵¹ K. Kaupmann, C. Bruns, F. Raulf, H. P. Weber, H. Mattes, H. Lubbert, *EMBO J.*, **1995**, *14*, 727-735.

Capítulo III.

Análogos de somatostatina con L-Dfp-OH.

3.1 Introducción.

La L-3-(3',5'-difluorofenil)alanina, L-β-3',5'-difluorofenilalanina, L-Dfp-OH o Dfp (si no se especifica, se trata del enantiómero L) es un aminoácido no natural perteneciente a los derivados fluorados de fenilalanina (figura 3.1). Estos derivados están siendo cada vez más estudiados como sustitutos en péptidos o proteínas debido a su capacidad para modular las propiedades químicas en las secuencias que ocupan.¹

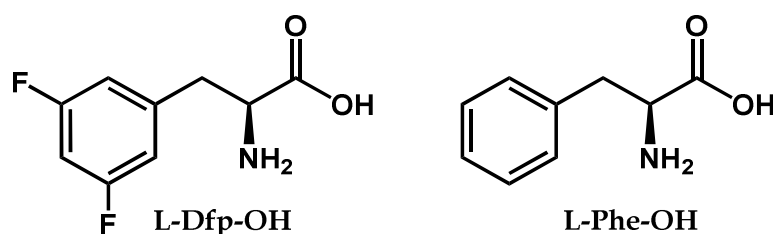


Figura 3.1. Comparación estructural entre L-β-3',5'-difluorofenilalanina (izquierda) y L-fenilalanina (derecha).

Aunque los aminoácidos no naturales fluorados alifáticos han demostrado su capacidad para estabilizar estructuras proteicas,² así como modular la acción en sitios de reconocimiento enzimático,³ su uso en residuos aromáticos es aún muy reciente y la contribución energética para aumentar la estabilización de la ordenación en proteínas está aún en estudio.⁴

La sustitución de hidrógenos de un anillo aromático por uno o más átomos de flúor causan una mínima perturbación estérica dado que el radio del flúor no es mucho mayor que el del hidrógeno. Sin embargo, sí ha sido demostrado que es capaz de aumentar la interacción aromática con otros anillos, debido a un incremento de la hidrofobia en el anillo y potenciación de las interacciones π-π.⁵

¹ a) S. Purser, P. R. Moore, S. Swallow, V. Gouverneur, *Chem. Soc. Rev.*, **2008**, 37, 320-330; b) M. Salwiczek, E. K. Nyakatura, U. I. M. Gerling, S. Ye, B. Kokschi, *Chem. Soc. Rev.*, **2012**, 41, 2135-2171.

² a) J. Horng, D. P. Raleigh, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125, 9286-9287; b) C. Jäckel, M. Salwiczek, B. Kokschi, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2006**, 45, 4198-4203.

³ B. Bilgiçer, K. Kumar, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2004**, 101, 15324-15329.

⁴ a) J. S. Thorson, E. Chapman, E. C. Murphy, P. G. Schultz, J. K. Judice, *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, 117, 1157-1158; b) H. Chiu, Y. Suzuki, D. Gullickson, R. Ahmad, B. Kokona, R. Fairman, R. P. Cheng, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128, 15556-15557.

⁵ J. C. Horng, D. P. Raleigh, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125, 9286-9287.

Tal como se expuso en la sección 2.3 de esta tesis, las interacciones aromáticas son el conjunto de tres fuerzas de magnitud e importancia relativa todavía hoy discutida: van der Waals, electrónicas e hidrofóbicas.⁶ El logP, parámetro de hidrofobicidad, calculado para el anillo aromático y su entorno en la Dfp tiene un valor de 2,84, ligeramente superior al de fenilalanina, de 2,52.⁷ Se trata por tanto de un aumento sutil de hidrofobicidad que incrementaría el valor de esta fuerza en una interacción aromática. Pero además, la inclusión de los dos átomos de flúor provoca una perturbación en el momento cuadrupolar de la molécula, ya que la elevada electronegatividad de estos halógenos mueve la densidad electrónica de la nube π anular hacia sus posiciones, tal como se aprecia en la figura 3.2.

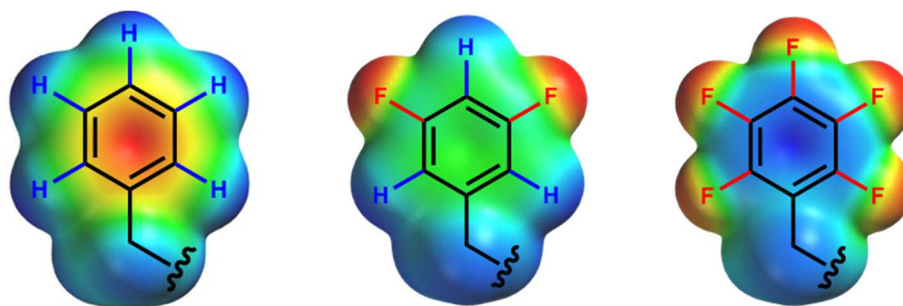


Figura 3.2. Densidades electrónicas comparadas entre el anillo fenilo de la Phe (izquierda), 3',5'-difluorofenilo de la Dfp (centro) y pentafluorofenilo de la Pfp (derecha). Azul = densidad electrónica baja. Rojo = densidad electrónica alta. Cálculo en Spartan (semi-empírico AM1).⁸

Al migrar la densidad electrónica hacia la periferia del anillo, una hipotética interacción entre un residuo de Dfp y una Phe en un mismo péptido debería de verse favorecida. Al tener potenciales electrostáticos inversos entre sí, permitiría un acercamiento en sentido *face-to-face* u *offset-stacked* (figura 3.3).

Los derivados fluorados de fenilalanina han sido usados previamente por otros grupos de investigación. Así, el grupo de Gellman⁹ utilizó la pentafluorofenilalanina (Pfp) para sustituir a las fenilalaninas presentes en la secuencia del subdominio *Chicken Villin Headpiece* (cVHP), en donde seis de las

⁶ C. A. Hunter, K. R. Lawson, J. Perkins, C. J. Urch, *J. Chem. Soc. Perkin. Trans.*, **2001**, 5, 651-669.

⁷ H. Zheng, K. Comeforo, J. Gao, *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, 131, 18-19.

⁸ Spartan '10 v. 1.1.0 (Wavefunction).

⁹ M. G. Woll, E. B. Hadley, S. Mecozzi, S. H. Gellman, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128, 15932-15933.

siete posibles sustituciones provocaban una disminución de la estabilidad del análogo peptídico.

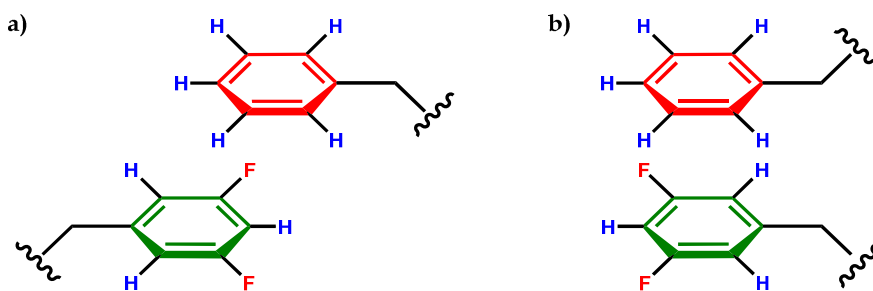


Figura 3.3. Interacciones aromáticas esperables entre anillos laterales de fenilalanina y 3',5'-difluorofenilalanina. **a:** izquierda, de tipo *offset-stacked*. **b:** derecha, de tipo *face-to-face*.

Por su parte, Gao y colaboradores⁷ utilizaron tetrafluorofenilalaninas en el cVHP, obteniendo péptidos más estables que con la secuencia nativa colocando estos aminoácidos no naturales en posiciones clave. La interpretación de estos hechos aparentemente contradictorios fueron explicados por el tipo de interacción aromática en un caso u otro: mientras que el anillo perfluorado rompería las aproximaciones *edge-to-face* presentes naturalmente en el péptido, la presencia de un hidrógeno aislado en las tetrafluorofenilalaninas permitirían mantener este acercamiento, además con un aumento en su fuerza al disminuir considerablemente la densidad electrónica en este hidrógeno. Por tanto, el mecanismo que envuelve el efecto de los derivados fluorados aromáticos no es fácil de predecir, ya que intervendrían fuerzas hidrófobas y de van der Waals, e interacciones cuadrupolares, dipolo-dipolo y dipolo-dipolo inducido.¹⁰

Pablo Antonio Martín-Gago, en su tesis doctoral,¹¹ determinó cómo un aminoácido de mayor densidad electrónica y elevado impedimento estérico como es la L- β -mesitilalanina provoca una restricción conformacional en función

¹⁰ a) H. Adams, J. Jiménez Blanco, G. Chessari, C. A. Hunter, C. M. R. Low, J. M. Sanderson, J. G. Vinter, *Chem. Eur. J.*, **2001**, *7*, 3494-3503; b) L. M. Salonen, M. Ellermann, F. Diederich, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2011**, *50*, 4808-4842.

¹¹ a) P. A. Martín-Gago, tesis doctoral *Synthesis of highly structured and receptor-selective tetradecapeptidic analogs of somatostatin: Fine-tuning the non-covalent interactions among their aromatic residues*, Universidad de Barcelona, 2013; b) P. Martín-Gago, M. Gómez-Caminals, R. Ramón, X. Verdaguer, P. Martín-Malpartida, E. Aragón, J. Fernández-Carneado, B. Ponsati, P. López-Ruiz, M. A. Cortés, B. Colás, M. J. Macías, A. Riera, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2012**, *51*, 1820-1825.

de qué fenilalanina sustituyese en la estructura de somatostatina (visto en la sección 2.4 de esta tesis). El siguiente paso fue constatar qué efecto provocaría el uso de anillos pobres en electrones; de entre las diecinueve posibilidades de mono o polisustitución que el anillo de la fenilalanina admite, la L- β -3',5'-difluorofenilalanina fue elegida para tal fin, para así incluirla en la secuencia nativa. Dicho aminoácido no natural no ha sido nunca probado sobre SST; sí fue probado por Redding y colaboradores¹² el efecto de la inclusión de flúor sobre el triptófano.

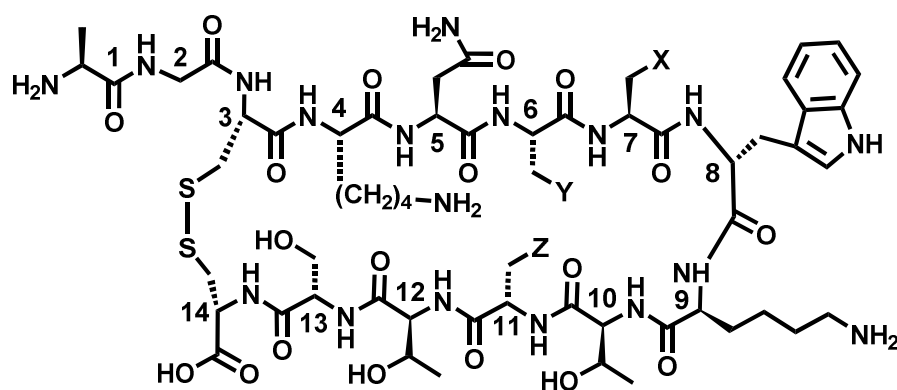
No sólo se podrá constatar si la menor densidad electrónica en la nube π anular de la Dfp, unido a su mayor hidrofobia, aumentaría la interacción π - π con otros residuos aromáticos, sino también estudiar el efecto que una interacción de tipo π -polar podría provocar en la somatostatina. Gracias a los tres hidrógenos restantes que quedan en la estructura de Dfp, se podrá determinar la cercanía espacial entre el anillo del aminoácido no natural con otros residuos presentes en la molécula, a partir de sus espectros bidimensionales homonucleares ^1H - ^1H , y en última instancia determinar la existencia de una conformación tridimensional preferida en disolución. Con la intención de ahondar en la relación entre modificaciones de secuencia-estructura tridimensional-actividad, se determinará el perfil de unión a SSTR1-5. Por ello, el Dr. Martín-Gago comenzó el estudio en estos derivados, que se completan en el presente capítulo.

3.2. Síntesis de análogos de somatostatina con L- β -3',5'-difluorofenilalanina.

Los análogos de somatostatina de la familia de la Dfp fueron diseñados mediante la sustitución sistemática individual de cada residuo de fenilalanina por el aminoácido no natural (tabla 3.1). Incluyendo de manera fija D-Trp8 se obtuvieron los tres primeros análogos [L-Dfp6_D-Trp8]-SST (**1**), [L-Dfp7_D-Trp8]-SST (**2**) y [L-Dfp11_D-Trp8]-SST (**3**). Como ya se expuso en la sección 2.1 de esta tesis, la inclusión del residuo D-Trp8 aumenta la potencia del derivado

¹² C. A. Meyers, D. H. Coy, W. Y. Huang, A. V. Schally, T. W. Redding, *Biochemistry*, **1978**, *17*, 2326-2331.

resultante, al incrementar su semivida, y además ayuda a estabilizar el β -giro al centrar en él al par D-Trp8_Lys9.¹³ Esta sustitución enantiomérica del triptófano ha sido una constante en la búsqueda de análogos de somatostatina, independientemente de la longitud del péptido final.



	6°	7°	8°	11°
[L-Dfp6_D-Trp8]-SST (1)	Dfp	Phe	D-Trp	Phe
[L-Dfp7_DTrp8]-SST (2)	Phe	Dfp	D-Trp	Phe
[L-Dfp11_DTrp8]-SST (3)	Phe	Phe	D-Trp	Dfp
[L-Dfp6_L-Msa7_D-Trp8]-SST (4)	Dfp	Msa	D-Trp	Phe
[L-Dfp11_L-Msa7_D-Trp8]-SST (5)	Phe	Msa	D-Trp	Dfp
[L-Dfp6,11_L-Msa7_D-Trp8]-SST (6)	Dfp	Msa	D-Trp	Dfp

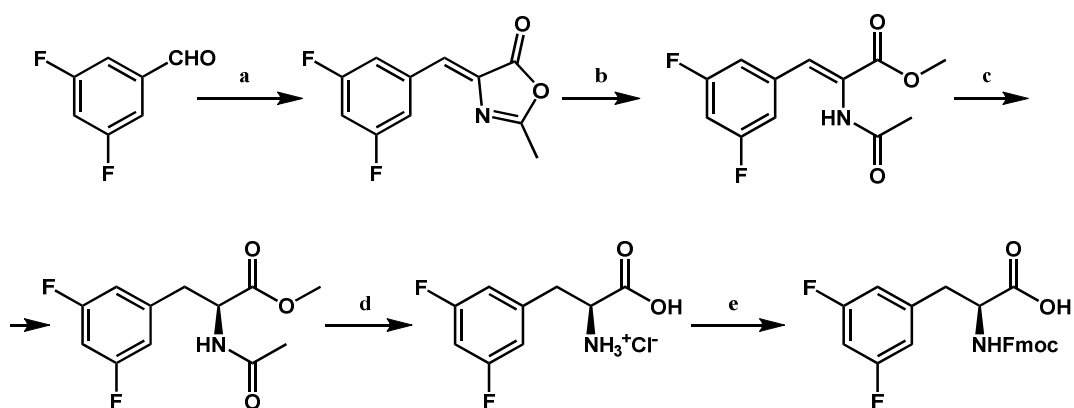
Tabla 3.1. Derivados fluorados de somatostatina presentados en este capítulo.

Gracias al conocimiento previo del grupo sobre el uso del aminoácido L-mesitilalanina (Msa),¹¹ éste fue incluido en posición 7 con el fin de potenciar la restricción conformacional para aumentar la afinidad y selectividad por el SSTR2. Como hemos visto en la sección 2.4 de la presente tesis doctoral, el péptido [L-Msa7_D-Trp8]-SST presenta una potente interacción *edge-to-face* entre los residuos 6 y 11, incrementada posiblemente por la presencia de Msa7 mediante una intervención indirecta. Sumando esta restricción al posible aumento de la interacción π - π entre los dos residuos restantes al introducir un anillo pobre en electrones, esperamos obtener nueva información que relacione los perfiles estructurales y de actividad de estos derivados. Por ello, se sintetizaron los péptidos [L-Dfp6_L-Msa7_D-Trp8]-SST (4) y [L-Dfp11_L-Msa7_D-Trp8]-SST (5), así como un tercer péptido que enfrente a dos Dfps, [L-Dfp6,11_L-Msa7_D-Trp8]-

¹³ a) B. H. Arison, R. Hirschmann, D. F. Veber, *Bioorg. Chem.*, **1978**, *7*, 447-451; b) O. Ovadia, S. Greenberg, B. Laufer, C. Gilon, A. Hoffman, H. Kessler, *Expert Opin. Drug Discov.*, **2010**, *5*, 655-671.

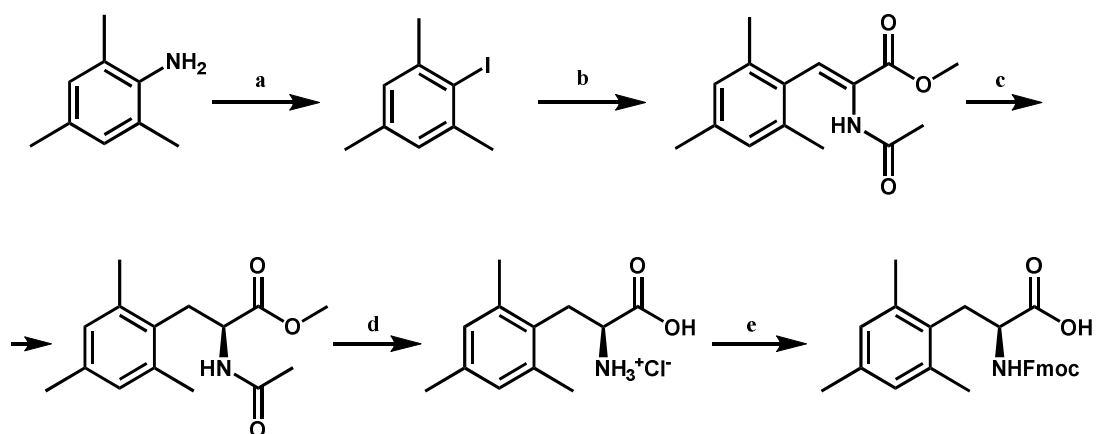
SST (6), para determinar cómo afectaría su momento cuadrupolar único a la interacción entre los residuos 6 y 11.

La Fmoc-L-Dfp-OH se sintetizó siguiendo el procedimiento experimental desarrollado por Martín-Gago en su tesis doctoral,^{11a} mediante un proceso de síntesis asimétrica, el cual se muestra en el esquema 3.1.



Esquema 3.1. Síntesis de Fmoc-L-Dfp-OH. a. N-Ac-Gly-OH, AcONa, Ac₂O, 2h, 100°C; b. MeONa, MeOH, 2h, 70°C; c. MaxPHOS-Rh cat 3%, H₂ (5 bar), MeOH, t.a.; d. HCl aq, 6h, reflujo; e. FmocOSu, Na₂CO₃, H₂O, acetona, 0° a t.a.

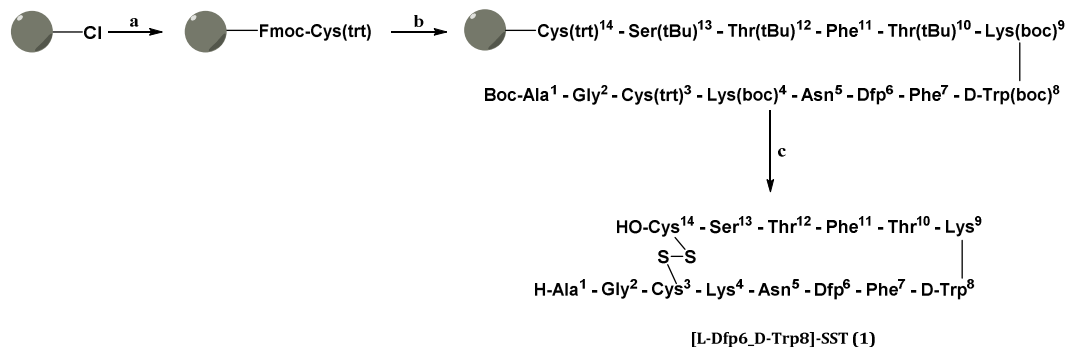
Así mismo, para la síntesis de Fmoc-L-Msa-OH se siguió el protocolo de síntesis asimétrica previamente descrito por nuestro grupo (esquema 3.2).^{11,14}



Esquema 3.2. Síntesis de Fmoc-L-Msa-OH. a. HCl aq, NaNO₂ aq, KI, 18h, 0°C; b. N-Ac-dehidro-Ala-OMe, tri-*o*-tolilfosfina, Pd(OAc)₂, Et₃N, CH₃CN, 10 h, 100 °C; c. MaxPHOS-Rh cat 3%, H₂ (50 bar), MeOH, t.a.; d. HCl aq, 6h, reflujo; e. FmocOSu, Na₂CO₃, H₂O, acetona, 0° a t.a.

¹⁴ R. Ramón, M. Alonso, A. Riera, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2007**, *18*, 2797–2802.

El resto de aminoácidos, incluyendo el Fmoc-D-Trp(boc)-OH, fueron adquiridos comercialmente. Todos los péptidos expuestos en este capítulo se sintetizaron en fase sólida, usando la estrategia Fmoc/^tBu en resina 2-clorotritil cloruro (esquema 3.3).¹⁵



Esquema 3.3. Ejemplo de síntesis: péptido 1. a) 1. Fmoc-L-Cys(trt)-OH (3 eq), DIEA (3 eq), 2. MeOH; b) 1. Piperidina 20% DMF, 2. Fmoc-Aaa-OH (1.5–3 eq), DIPCDI (3 eq), HOBT (3 eq), DMF (x12), 3. Piperidina 20% DMF, 4. Boc-Ala-OH, DIPCDI (3 eq), HOBT (3 eq), DMF; c) 1. CH₂Cl₂/TFE/AcOH, 2. I₂, 3. TFA/CH₂Cl₂/anisol/H₂O.

3.3. Ensayos biológicos.

Para determinar el perfil de unión a receptores que tienen estos análogos no naturales, se siguió el protocolo diseñado por Rens-Domiano *et al*,¹⁶ en donde células de la línea CHO-K1 son transfectadas con un plásmido que contiene un SSTR que se sobreexpresa. Estas células son elegidas dada su robustez, así como el bajo nivel de expresión de proteínas de membrana constitucionales que presenta. Una vez separada la membrana del resto de la célula, se procede a realizar un ensayo de desplazamiento de somatostatina marcada radiactivamente, [¹²⁵I-Tyr¹¹]-SST, en donde tanto el péptido radiactivo como las membranas se presentan a concentraciones fijas, y los análogos a probar se disponen a concentraciones variables. Tras ser incubado en el medio correspondiente, se puede observar el desplazamiento de somatostatina marcada, lo que permite obtener las respectivas curvas de inhibición que dan,

¹⁵ G. B. Fields, R. L. Noble, *Int. J. Protein Res.*, **1990**, *35*, 161-214.

¹⁶ S. Rens-Domiano, S. F. Law, Y. Yamada, S. Seino, G. I. Bell, T. Reisine, *Mol. Pharmacol.*, **1992**, *42*, 28-34.

como resultado, un valor de K_i para un receptor en concreto. Estos ensayos se realizaron por la empresa Eurofins Scientific¹⁷, ya que los desarrollan según la metodología aquí descrita.

En la tabla 3.2 se muestran los perfiles de unión a receptores, expresados como K_i . Tal como se puede observar, todos los derivados presentan un perfil de unión por SSTR2 superior al octreótido. De ellos, **3** es el que más se acerca a los valores de la SST, al tener una K_i en el mismo orden. **1** y **2** se acercan a los valores de la hormona nativa por SSTR3. Los derivados **4**, **5** y **6**, todos ellos con Msa7, pierden afinidad por SSTR1, SSTR4 y SSTR5 en gran medida, y en menor medida por SSTR3; esto genera que tengan un perfil de selectividad interesante que recordaría al del mismo octreótido, siendo el que mejor lo refleja el análogo **4**.

	SSTR1 (nM)	SSTR2 (nM)	SSTR3 (nM)	SSTR4 (nM)	SSTR5 (nM)
SST14	1,88	0,016	0,25	1,55	0,76
Octreótido	480	0,77	13,0	>1000	21,0
[L-Dfp6_D-Trp8]-SST (1)	21,0	0,35	0,38	16,0	5,02
[L-Dfp7_DTrp8]-SST (2)	14,0	0,36	1,10	12,0	2,10
[L-Dfp11_DTrp8]-SST (3)	14,0	0,066	3,81	11,0	5,00
[L-Dfp6_L-Msa7_D-Trp8]-SST (4)	38,0	0,17	5,46	150	82,0
[L-Dfp11_L-Msa7_D-Trp8]-SST (5)	19,0	0,26	23,0	62,0	31,0
[L-Dfp6,11_L-Msa7_D-Trp8]-SST (6)	55,0	0,31	12,0	69,0	45,0

Tabla 3.2. Datos de afinidad frente a los receptores SSTR1-5. Debido al escaso número de mediciones, las cifras se muestran sin error.

Una vez analizadas las estructuras de estos péptidos, se volverá sobre estos resultados para tratar de establecer un patrón que relacione ambas características para estos seis análogos.

3.4. Estrategia de estudio mediante RMN.

Todos los péptidos de la presente tesis fueron caracterizados mediante resonancia magnética nuclear. Para cada molécula se adquirieron sus respectivos espectros homonucleares monodimensionales y bidimensionales (¹H-¹H TOCSY

¹⁷ Eurofins Panlabs Inc., de Eurofins Scientific.

y NOESY 200 ms y 350 ms, 600 MHz) disueltos en tampón fosfato a pH = 6,5 en presencia de un 10% de agua deuterada. Todos los espectros se analizaron hasta identificar las resonancias correspondientes a cada aminoácido y su conexión en la secuencia así como los NOEs de media y larga distancia que definen las diferentes conformaciones características de cada una de las moléculas. Estos espectros fueron procesados con XwinNMR y analizados mediante el programa de visualización de espectros CARA.¹⁸

En un experimento TOCSY, la magnetización se transfiere dentro de un mismo sistema de espines mediante un acoplamiento escalar sucesivo a través de los enlaces. De esta manera, en el espectro aparecen patrones de señales característicos para cada aminoácido. Debido a que los heteroátomos y carbonos cuaternarios rompen la transferencia de acoplamiento, es una herramienta eficaz para determinar los protones pertenecientes a una misma cadena lateral.

Por otra parte, un experimento NOESY permite determinar la cercanía espacial entre distintos sistemas de espines que se acoplen mediante interacciones dipolares, aunque dichos espines no se encuentren unidos de forma covalente. Esto es debido a que el campo magnético efectivo de cada núcleo se ve afectado por la presencia de otros núcleos con actividad magnética. De esta forma, al lanzar un pulso de determinada intensidad, uno de estos espines es excitado. El dipolo magnético perturba el estado de equilibrio del otro, produciéndose una relajación cruzada al transferirse la magnetización a través del espacio, lo que provoca cambios en la intensidad de la señal detectada del segundo sistema de espín. Esta perturbación será el efecto nuclear Overhauser (NOE) y el volumen de dicha señal representará la cercanía espacial entre los dos núcleos medidos. Trabajamos con dos tiempos de mezcla, 200 ms y 350 ms, para discriminar entre átomos a menor o mayor distancia respectivamente.

Mediante estos dos experimentos, se determina el desplazamiento químico de cada protón de la proteína, así como las relaciones entre sí. En todos

¹⁸ CARA para sistema operativo OS X, versión 1.9. R. Keller, The Computer Aided Resonance Assignment Tutorial, 1st ed. CANTINA. Verlag, 2004.

los casos, el procedimiento empieza con la asignación de señales secuenciales TOCSY y NOESY, concretamente de los protones amídicos y los localizados sobre los C α y C β , para continuar posteriormente con las señales correspondientes a los NOE de media y larga distancia, utilizando como estrategia de asignación el protocolo de Wuethrich.¹⁹ En la figura 3.4, aparecen todos los aminoácidos utilizados en la síntesis de estos derivados, así como la denominación para cada uno de sus protones.

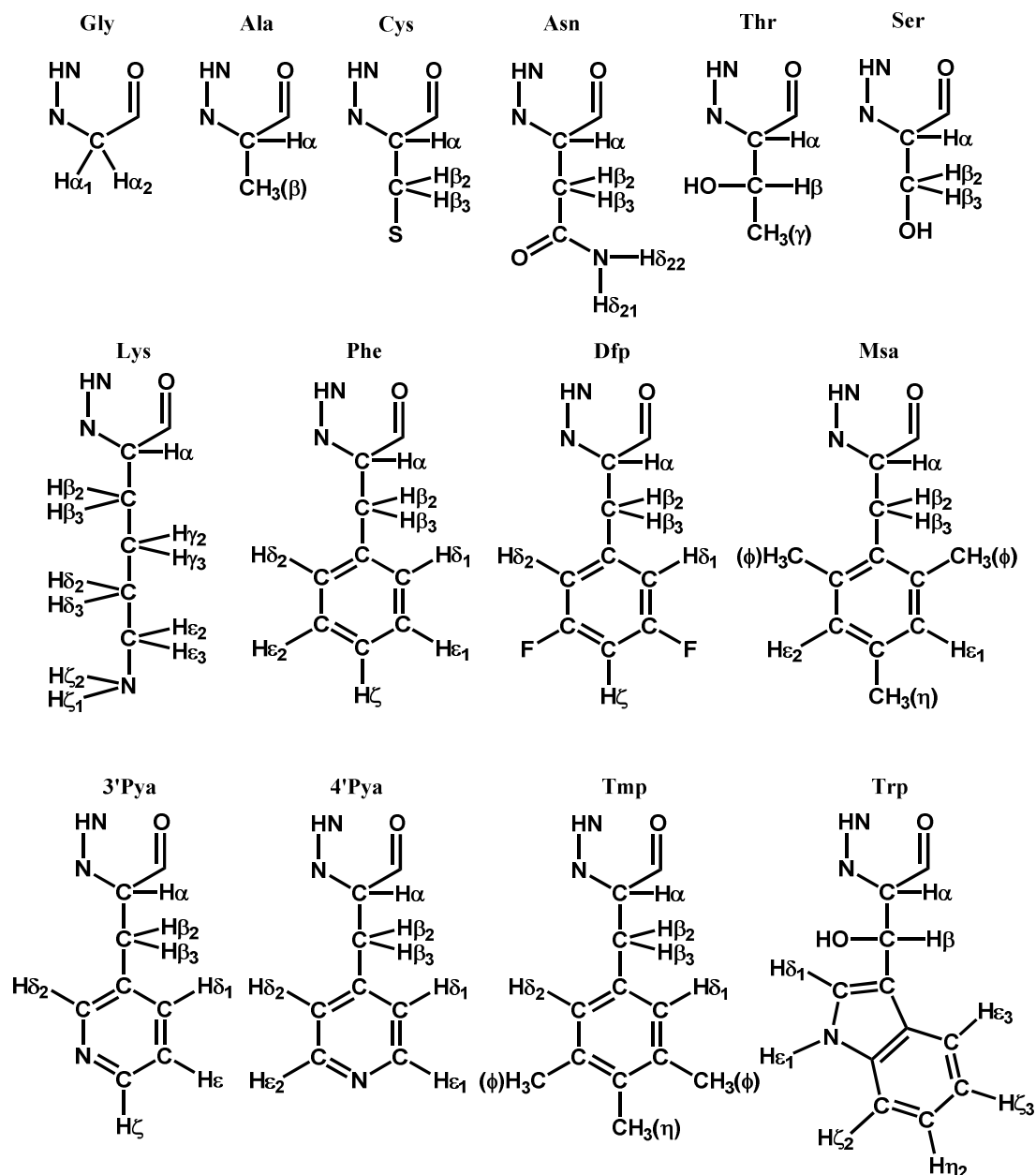


Figura 3.4. Nomenclatura de protones en los distintos aminoácidos.

¹⁹ K. Wuethrich, G. Wider, G. Wagner, W. Braun, *J. Mol. Biol.*, **1982**, *155*, 311-319. Este mismo proceder fue aplicado para la familia de péptidos de la Msa analizada previamente en nuestro grupo de investigación.

Para nombrar cada protón, se utilizó la nomenclatura IUPAC de cadenas laterales de aminoácidos (α , β , γ ...) en función de su posición relativa respecto al C carboxílico, distinguiéndolos con numeración en caso de que en un par de protones aparezcas desdoblados en el espectro al no ser equivalentes.

En nuestro caso, la densidad de señales NOE que un espectro presenta da una idea inicial sobre si dicho péptido presenta una configuración tridimensional mayoritaria: si el número de NOEs de larga distancia es bajo, indica una secuencia flexible sin ninguna ordenación preferente en disolución. Cuando las señales NOE son numerosas, es probable que dicha secuencia tenga predilección hacia una conformación preferida. Esto se aprecia en las figuras 3.5 y 3.6, donde se amplían, respectivamente, los espectros NOESY de los derivados [L-Dfp11]-SST y [L-Dfp11_L-Msa7_D-Trp8]-SST (5).

El derivado [L-Dfp11]-SST, no incluido en esta tesis, presenta un volumen muy bajo de señales en sus espectros, aunque es suficiente para secuenciar y asignar cada uno de sus protones. En nuestros péptidos de estudio, la ausencia de señales NOE de media y larga distancia presupone que este péptido cuenta con una elevada flexibilidad en disolución, que le permite adoptar distintas disposiciones tridimensionales. Sería una situación análoga a la ocurrida en SST.

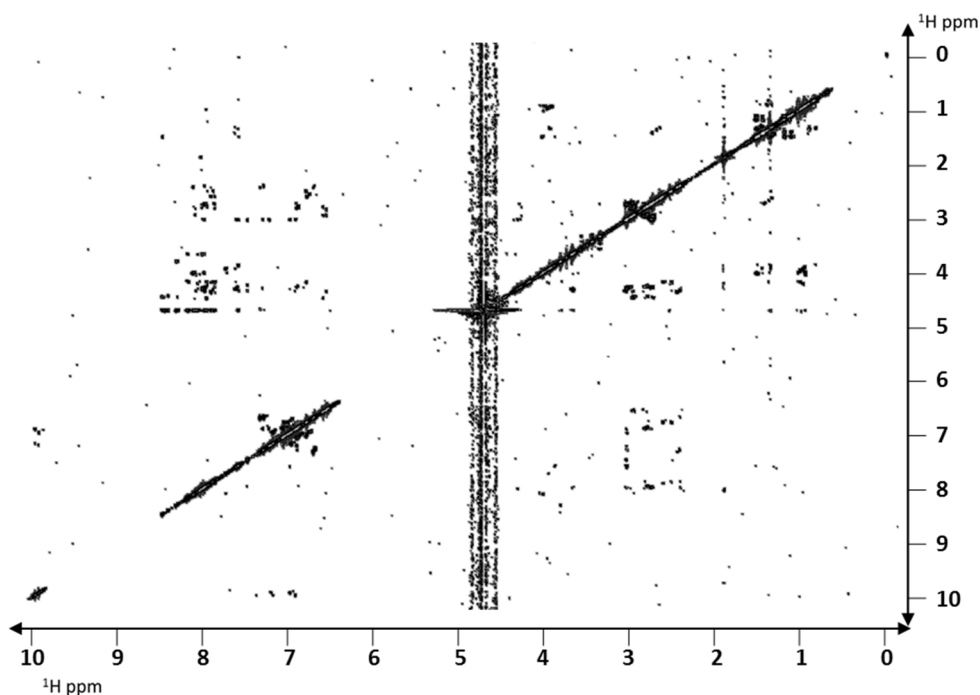


Figura 3.5. Espectro de NOESY 350 ms de [L-Dfp11]-SST, de baja densidad de señales.

El derivado [L-Dfp11_L-Msa7_D-Trp8]-SST (5), por su parte, presenta un elevado número de señales en sus espectros bidimensionales. Esto permite localizar señales NOE de media y larga distancia, una información que podrá ser volcada para tratar de encontrar una conformación preferida en disolución.

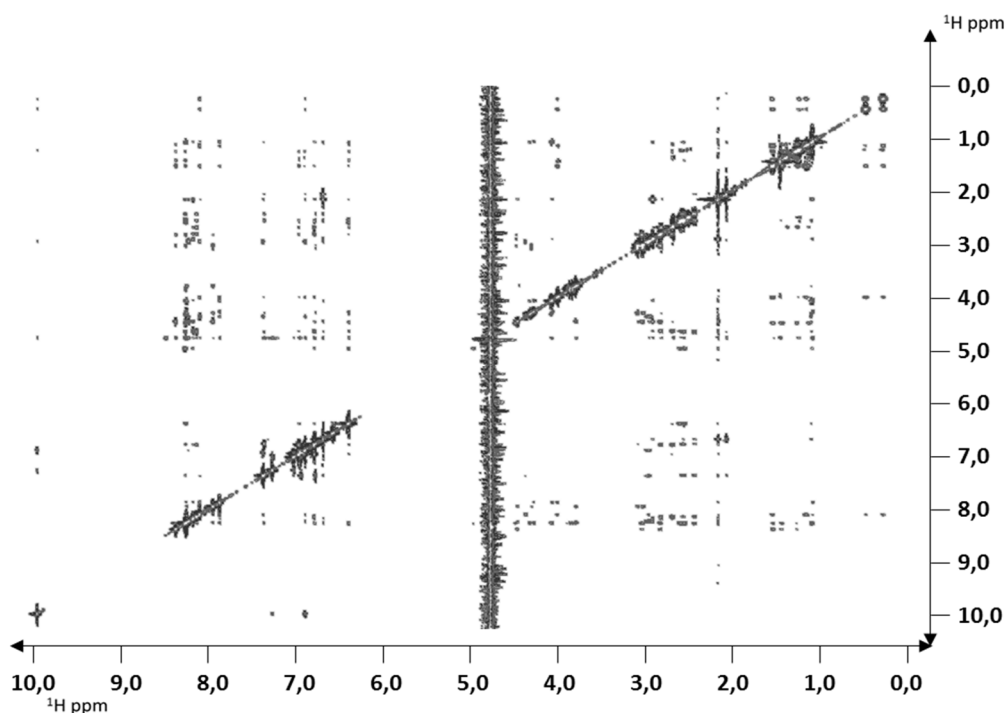


Figura 3.6. Espectro de NOESY 350 ms de [L-Dfp11_L-Msa7_D-Trp8]-SST (5), de alta densidad de señales.

Una vez asignadas las señales (figura 3.7), se integraron para determinar el volumen del pico de cada señal NOE. Dicha información fue traspasada y analizada mediante el *software* de cálculo CNS (Crystallography & NMR System),²⁰ a través de la interfaz StructCalc.²¹ El programa CNS permite hacer minimizaciones de estructuras utilizando restricciones provenientes del Force Field PARALLHDG²² (que aporta datos experimentales previos observados y validados, así como cálculos cuánticos teóricos), y de nuestras restricciones experimentales, que en este caso vendrían de los espectros de resonancia

²⁰ A. T. Brünger, P. D. Adams, G. M. Clore, W. L. DeLano, P. Gros, R. W. Grosse-Kunstleve, J. S. Jiang, J. Kuszewski, M. Nilges, N. S. Pannu, R. J. Read, L. M. Rice, T. Simonson, G. L. Warren *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **1998**, *54*, 905-921.

²¹ P. Martín-Malpartida, M. J. Macías, datos sin publicar.

²² J. P. Linge, M. Nilges, *J. Biomol. NMR*, **1999**, *13*, 51-59.

magnética nuclear. De esta forma, las posibles estructuras teóricas van siendo moduladas mediante las restricciones de distancia impuestas por señales NOE.

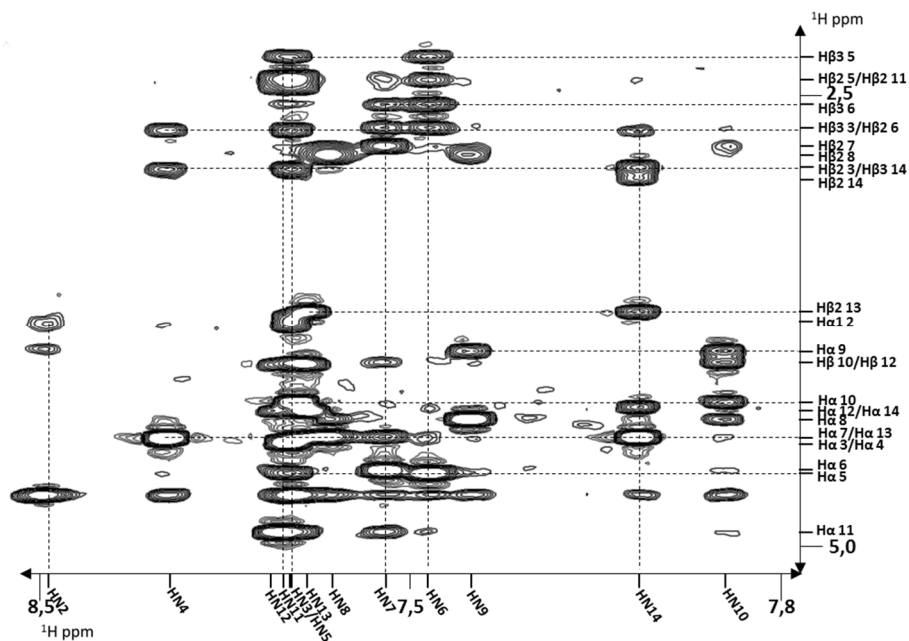


Figura 3.7. Asignación de señales en la zona Hα y Hβ/HN de [L-Dfp11_L-Msa7_D-Trp8]-SST (5) (NOESY 350 ms).

La visualización de los resultados obtenidos (y las figuras) se realizaron con el programa PyMOL.²³ Los primeros cálculos permiten obtener patrones de comportamiento en las estructuras, sin que éstas tengan aún, necesariamente, un alto grado de convergencia (figura 3.8).

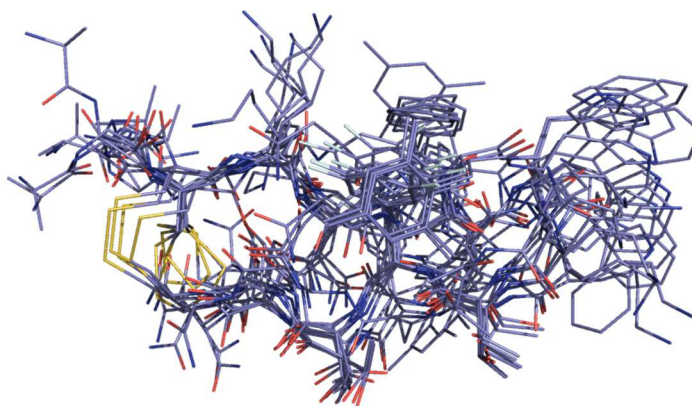


Figura 3.8. Primeros resultados a nivel de cálculo para la estructura tridimensional de [L-Dfp11_L-Msa7_D-Trp8]-SST (5).

Para obtener un mayor grado de convergencia, se corrigen aquellas señales NOE que incurran en violaciones de distancia según los resultados del

²³ W. L. DeLano. The Pymol molecular graphics system. Palo Alto, CA: DeLano Scientific, 2002. USA.

programa. Además, aportamos nuevas restricciones a nivel de cálculo, sobre los ángulos diedros ψ y ϕ del esqueleto peptídico: aquellos grupos de estructuras que cumpliesen con los datos esperados a nivel de RMN, se les impuso un corto margen de flexibilidad en sus ángulos ψ y ϕ , dentro de las regiones permitidas según los diagramas Ramachandran,²⁴ minimizando así la variabilidad de giro en el esqueleto peptídico.

Cuando las estructuras de menor energía tenían un alto grado de convergencia sin contradecir los datos experimentales tras lanzar varios cálculos, y los ángulos diedros de los aminoácidos intracíclicos estaban todos en regiones permitidas según los gráficos Ramachandran, se dio dicha estructura por validada y definitiva (figura 3.9). Todas las estructuras se refinaron en presencia de agua.

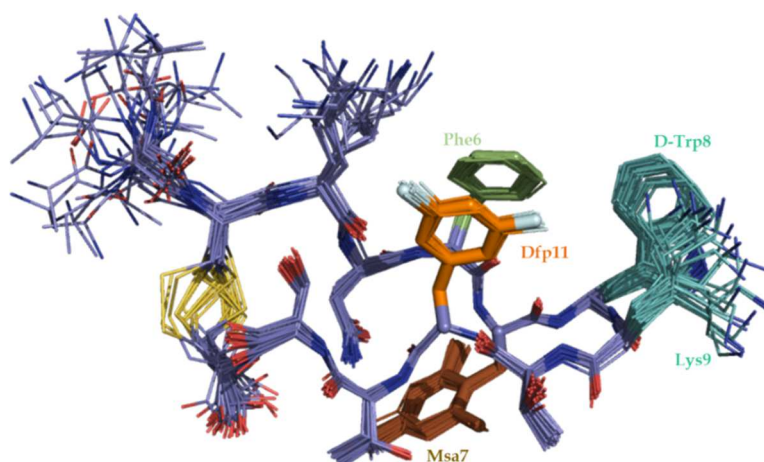


Figura 3.9. Superposición de las 25 estructuras de menor energía de [L-Dfp11_L-Msa7_D-Trp8]-SST (5) según los datos experimentales de RMN, con un elevado grado de convergencia y escasa flexibilidad en sus cadenas laterales.

3.5. Estructura.

Todos los derivados de la familia de la L- β -3',5'-difluorofenilalanina, teniendo como contraión TFA-, fueron analizados mediante técnicas espectroscópicas de RMN en agua tamponada a pH = 6,5, con las que se obtuvo sus respectivos espectros bidimensionales homonucleares ^1H - ^1H TOCSY y

²⁴ G. N. Ramachandran, C. Ramakrishnan, V. Sasisekharan, *J. Mol. Biol.*, **1963**, 7, 95-99.

NOESY.¹⁹ Al identificar los correspondientes NOEs e integrarlos, los volúmenes de señal obtenidos fueron introducidos en el programa de cálculo CNS²⁰ mediante la interfaz StrutCalc,²¹ lanzando un número variable de cálculos, hasta que las estructuras de menor energía fuesen coherentes con los datos espectrales, mostrasen convergencia y no incurriesen en violación de ángulos diedros según los diagramas de Ramachandran.²⁴

La inclusión del D-Trp en posición 8 aumenta la interacción alifática-aromática del par D-Trp8_Lys9, lo que se traduce en un elevado apantallamiento de los H γ de la Lys9 y en una estabilización del giro β del péptido, al reorientarse dejando centrados estos dos aminoácidos.^{11b,13}

Los H_{AR} de la Dfp se encuentran más apantallados que los de Phe. Sin embargo, por el hecho de carecer de ambos H ϵ , y que tanto los dos H δ como su H ζ siguen encontrándose en los espectros bidimensionales dentro del cuadrante del resto de protones aromáticos, puede resultar difícil establecer claramente las señales NOE correspondientes a una interacción aromática-aromática. Esto no impide que se vean claramente señales NOE alifático-aromáticas, correspondientes a la cercanía espacial entre el anillo difluorado con protones alifáticos de las cadenas laterales de distintos aminoácidos.

La mesitilalanina, con sus tres grupos metilo, no sólo ayuda a estabilizar la molécula mediante interacciones aromáticas directas o indirectas dando un mayor nivel de ordenación; sino que, además, la densidad de señales de sus nueve protones C_{AR}-CH₃, junto a los dos H ϵ muy apantallados, aportan a los espectros un mayor volumen de interacciones NOE. Esto se traduce en una información extra que, introducida en el programa de cálculo, ayuda a obtener la conformación tridimensional mayoritaria más fácilmente.

3.5.1. Análogo [L-Dfp6_D-Trp8]-SST (1).

El primer péptido estudiado de esta familia, [L-Dfp6_D-Trp8]-SST (1), presenta en disolución una estructura mayoritaria, con una cierta variabilidad conformacional en sus cadenas laterales, pero que dan una imagen clara de su

estructura principal con una elevada convergencia del esqueleto peptídico y cadenas laterales (figura 3.10).²⁵ Así, en la región comprendida entre los residuos 6 y 11 destaca el acercamiento entre los residuos Dfp6-Phe11 mediante una interacción de tipo *offset-stacked*, no completamente plana, a consecuencia de un acercamiento de los H β y H δ de Dfp6 con los H_{AR} de Phe11. Coincidiría con el modelo electrostático de Hunter y Sanders²⁶ y la interacción π -polar descrita por Cozzi y Siegel,²⁷ de manera que la disminución de la densidad π electrónica del anillo de Dfp reduce la repulsión electrostática entre su nube π y la de Phe, por lo que la interacción entre ambos aminoácidos se incrementa.

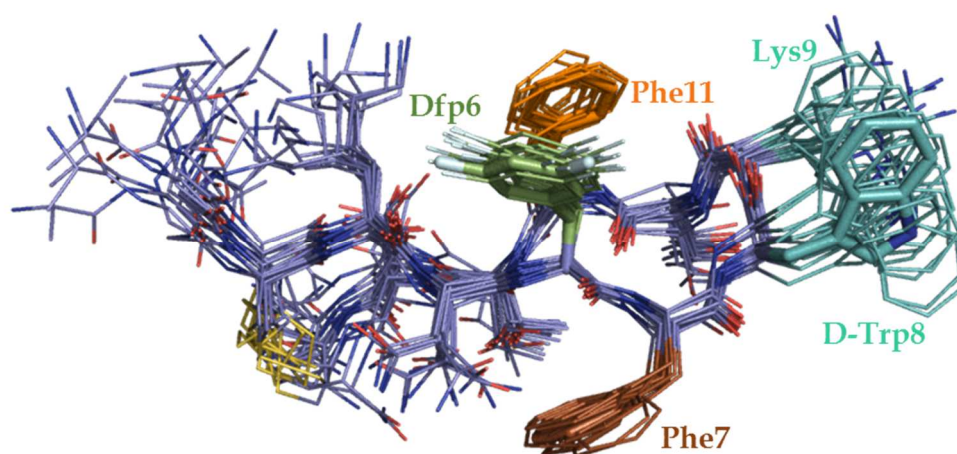


Figura 3.10. Superposición de las 25 estructuras de menor energía de [L-Dfp6_D-Trp8]-SST (1) según los datos experimentales de RMN.

Al mismo tiempo, Phe7 se dispone por el lado contrario del péptido, en una orientación similar a la del par 6-11; se detectan NOEs de larga distancia entre los H_{AR} de Phe7 y los protones correspondientes a las cadenas laterales de Asn5, Thr10 y Thr12. Por su parte, los aminoácidos D-Trp8 y L-Lys9 presentan numerosas interacciones NOE en los espectros entre sí, lo que se traduce en la cercanía espacial que demuestran. A causa de la ausencia de NOEs entre las

²⁵ Principales señales NOE que satisfacen esta estructura: a) **H δ de Phe7** con H β 2 de Asn5; H γ de Thr10; H γ de Thr12. b) **H ϵ de Phe7** con H β 2 y H δ 22 de Asn5; H γ de Thr12. c) **H δ de Phe11** con H α , H β 2, H β 3 y H δ de Dfp6. d) **H ϵ de Phe11** con H β 2, H β 3, H δ y H ζ de Dfp6.

Señales NOE que no satisfacen esta estructura que aparecen en el espectro bidimensional: a) **H β 2 de Asn5** con H δ de Dfp6; H ϵ de Phe11.

²⁶ C. A. Hunter, J. K. M. Sanders. *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, *112*, 5525-5534.

²⁷ F. Cozzi, F. Ponzini, R. Annunziata, M. Cinquini, J. S. Siegel, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1995**, *34*, 1019-1020.

cadena lateral de estos dos aminoácidos y el resto de la molécula, estas cadenas presentan una distribución variable, traducido en dos “poblaciones” de orientación distinta, pero una mayoritaria que apunta hacia la misma cara en donde se encuentran Dfp6 y Phe11.

3.5.2. Análogo [L-Dfp7_D-Trp8]-SST (2).

El derivado [L-Dfp7_D-Trp8]-SST (2) presenta suficiente información en sus espectros bidimensionales para determinar una estructura mayoritaria en disolución. Su estudio mediante espectroscopia permite determinar que, en este caso, los tres anillos aromáticos presentan interacciones NOE entre ellos, lo que se traduce en una formación tridimensional especial representada en la figura 3.11.²⁸

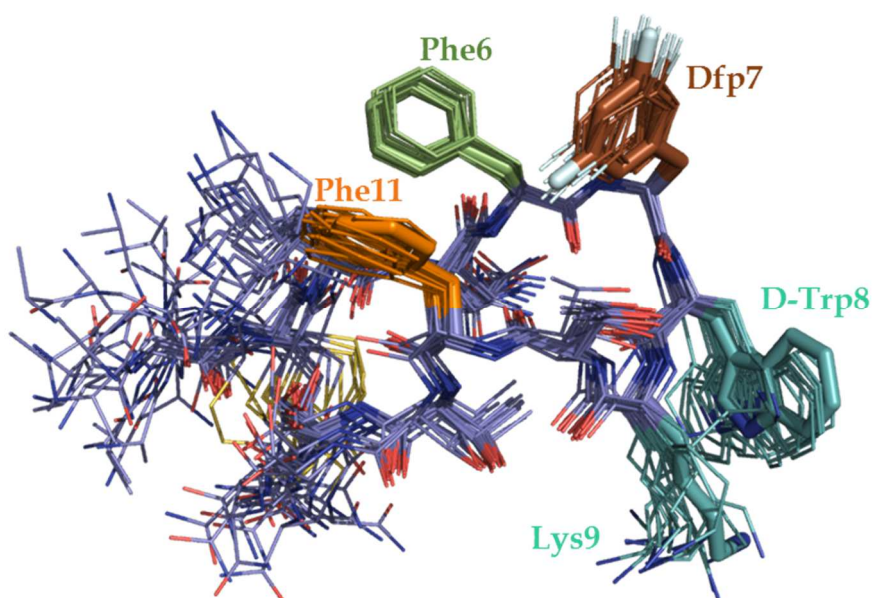


Figura 3.11. Superposición de las 25 estructuras de menor energía de [L-Dfp7_D-Trp8]-SST (2) según los datos experimentales de RMN.

Esta ordenación, de tipo clúster, es similar a la que se produce en el péptido [L-Msa6_D-Trp8]-SST (figura 2.10). En el caso del derivado con mesitilalanina, Msa6 favorecía una interacción *face-to-face* con Phe11 cuya nube π

²⁸ Principales señales NOE que satisfacen esta estructura: a) **H δ de Dfp7** con H α , H β 2 y H β 3 de Phe6. b) **H δ de Phe11** con H β 2 y H β 3 de Phe6; H β 2 de Dfp7; H γ de Thr10. c) **H ϵ de Phe11** con H β 2 y H β 3 de Phe6; H β 2 de Dfp7; H γ de Thr10.

Señales NOE que no satisfacen esta estructura: a) **H γ de Thr12** con H δ y H ϵ de Phe11.

de electrones recibía, a su vez, a Phe7 en un acercamiento *edge-to-face*. Por el contrario, en **2** Phe6-Phe11 interactúan de forma *edge-to-face*, tal como se predice según los modelos de Hunter,²⁶ mientras que Dfp7 se acerca a Phe6 *face-to-face*, y aproximando uno de sus flúor al perímetro pobre en electrones del Phe11.

En este péptido, la posición que Dfp7 ocupa y que discrepa de los otros péptidos posiblemente sea debido a que, con el empobrecimiento de su nube π , las interacciones aromáticas en disolución se vean favorecidas, de manera que se acerca a la región aromática formada por ambas fenilalaninas. El par D-Trp8_Lys9 de nuevo se encuentra muy próximo en el espacio, por las numerosas señales NOE entre ambas cadenas, con una cierta variabilidad en la posición en sus cadenas laterales, a causa de la ausencia de interacciones entre estas cadenas y el resto del esqueleto peptídico. Se orientan, principalmente, en la cara hacia donde concurre el clúster.

3.5.3. Análogo [L-Dfp11_D-Trp8]-SST (3).

El siguiente análogo, [L-Dfp11_D-Trp8]-SST (**3**), presenta una elevada convergencia en sus estructuras de menor energía que dan una estructura mayoritaria, mostrada en la figura 3.12.²⁹ Tal como ocurría en **1**, el par 6-11 se dispone mediante una interacción π muy próxima de tipo *offset-stacked*, acercándose uno de los flúores a la nube π de la Phe6. Phe7 de nuevo se dispone por la cara contraria del péptido, aunque en este caso orienta su anillo en sentido contrario a la del par aromático, justo al contrario que en **1**; aquí, los H_{AR} de Phe7 se aproximan espacialmente a los H β y H γ de ambas treoninas en posiciones 10 y 12. Y el par D-Trp8_Lys9 presenta una única disposición espacial, en donde sus cadenas laterales siguen la dirección proyectada desde el esqueleto peptídico. En este caso, la información trasladada desde los espectros bidimensionales, en los

²⁹ Principales señales NOE que satisfacen esta estructura: a) **H δ de Phe7** con H β 2 de Asn5; H α de Thr10; H γ de Thr12. b) **H ϵ de Phe7** con H β 2 y H δ 22 de Asn5; H γ de Thr12. c) **H δ de Phe6** con H α de Lys9; H α , H β 2, H β 3 y H δ de Dfp11. d) **H ϵ de Phe6** con H δ y H ζ de Dfp11.

Señales NOE que no satisfacen esta estructura que aparecen en el espectro bidimensional: a) **H γ de Thr12** con H δ de Phe6; H δ de D-Trp8; H δ de Dfp11.

que se detecta interacciones de tipo NOE entre los H α y H β de D-Trp8 y Lys9 con el resto de la secuencia, permiten obtener una única población del par que conforma el giro β .

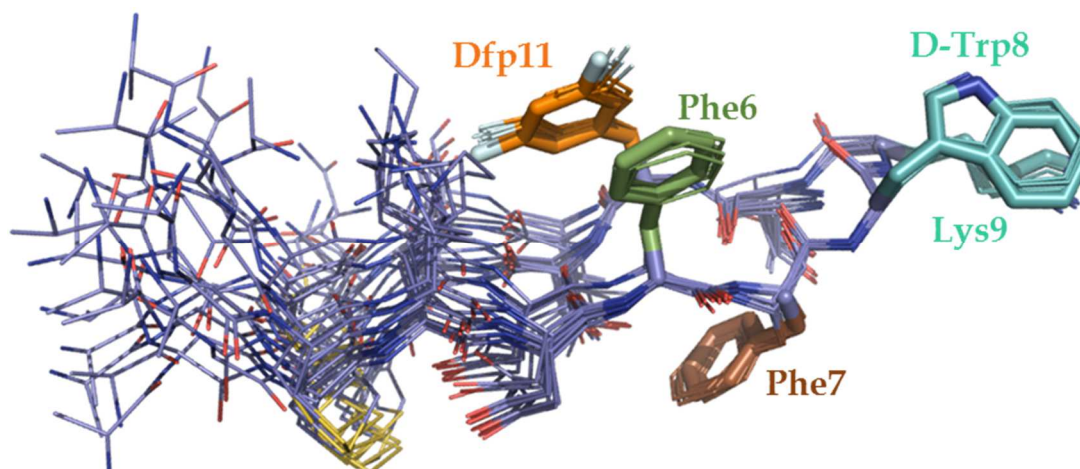


Figura 3.12. Superposición de las 20 estructuras de menor energía de [L-Dfp11_D-Trp8]-SST (3) según los datos experimentales de RMN.

3.5.4. Análogo [L-Dfp6_L-Msa7_D-Trp8]-SST (4).

Como ya se ha comentado, la presencia de Msa en posición 7 dio lugar a derivados con una estructura más definida, en donde dicho aminoácido no natural ayudaba de manera indirecta a potenciar la interacción entre Phe6 y Phe11, aumentando a su vez la afinidad y selectividad por SSTR2. Siguiendo esta idea, se introdujo en posición 6 el residuo Dfp, con el fin de incrementar aún más dicha interacción π - π , dando como resultado el derivado [L-Dfp6_L-Msa7_D-Trp8]-SST (4). Dicho péptido, cuya estructura se ofrece en la figura 3.13,³⁰ muestra una arquitectura similar a la de [L-Msa7_D-Trp8]-SST (figura 2.11). Sin embargo, la interacción que se observa entre ambos residuos es de tipo *offset-stacked*, y no de tipo *edge-to-face* como ocurre en el homólogo no fluorado. La Msa7 queda orientada en la cara contraria a la pareja Dfp6-Phe11, acercando sus protones

³⁰ Principales señales NOE que satisfacen esta estructura: a) **H ρ de Msa7** con H δ 21 y H δ 22 de Asn5; H δ 1 de D-Trp8. b) **H η de Msa7** con H δ 21 y H δ 22 de Asn5. c) **H ϵ de Msa7** con H β 2, H β 3 y H δ 21 de Asn5; H γ de Thr10; H γ de Thr12. d) **H δ de Dfp6** con H α , H β 2, H δ y H ϵ de Phe11. e) **H δ de Phe11** con H β 2, H β 3 y H ζ de Dfp6.

Señales NOE que no satisfacen esta estructura: a) **H ϵ 3 de D-Trp8** con H ρ y H η de Msa7.

aromáticos y metílicos a Asn5, Thr10 y Thr12. Una vez más D-Trp8_Lys9 convergen en una posición mayoritaria que, como en **3**, siguen la proyección del esqueleto peptídico.

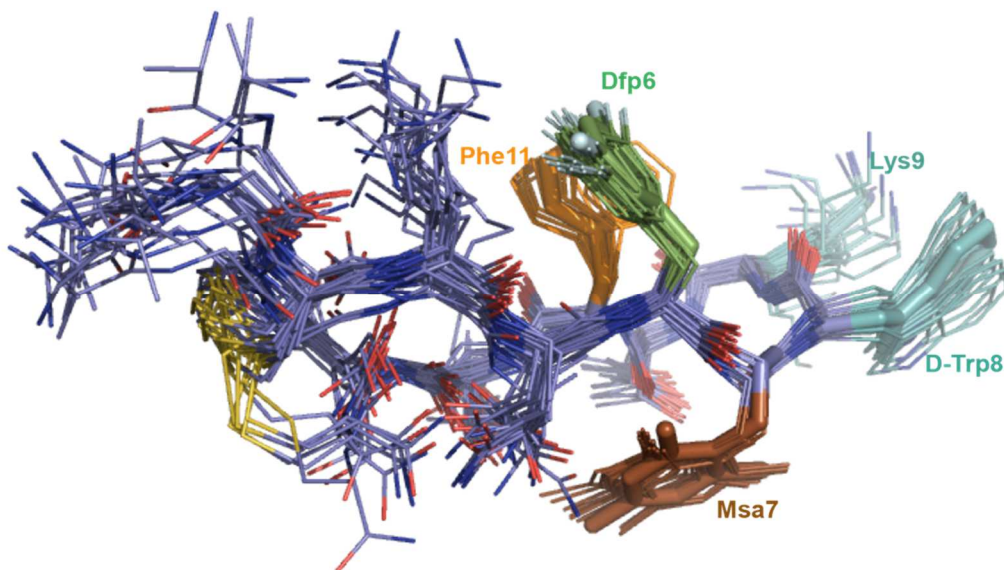


Figura 3.13. Superposición de las 25 estructuras de menor energía de [L-Dfp6_L-Msa7_D-Trp8]-SST (**4**) según los datos experimentales de RMN.

En la figura 3.14 se puede apreciar la similitud en las interacciones entre Dfp6 y Phe11 de los péptidos **1** y **4**. Si bien ambos acusan un acercamiento *offset-stacked*, su posición espacial relativa respecto a otros aminoácidos difiere. Así, Phe11 en **1** se aleja del dúo D-Trp8_Lys9, mientras que en **4** se acerca.

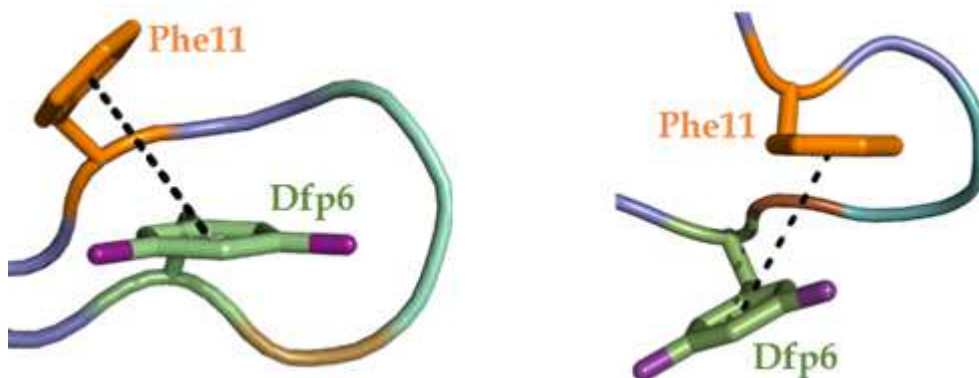


Figura 3.14. Comparación de la interacción Dfp6-Phe11 en **1** (izquierda) y **4** (derecha).

3.5.5. Análogo [L-Dfp11_L-Msa7_D-Trp8]-SST (**5**).

El siguiente paso fue determinar el efecto de la Dfp en posición 11, en el péptido [L-Dfp11_L-Msa7_D-Trp8]-SST (**5**). Como **3**, presenta una conformación

mayoritaria,³¹ aunque con una distribución tridimensional distinta (figura 3.15): el par 6-11 en una cara del péptido y 7 por la otra se mantiene, pero la orientación de Phe6-Dfp11 se invierte.

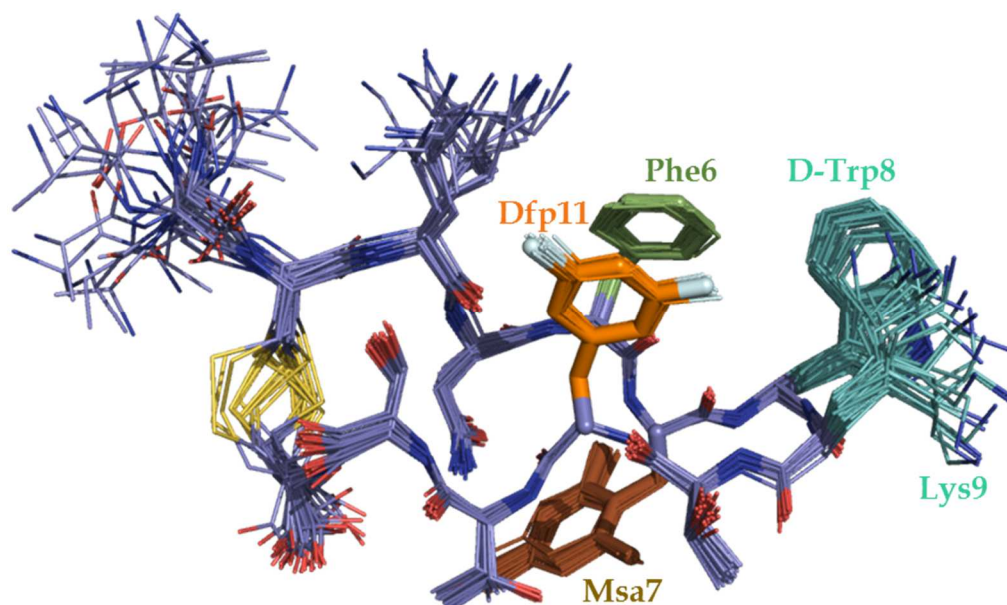


Figura 3.15. Superposición de las 25 estructuras de menor energía de [L-Dfp11_L-Msa7_D-Trp8]-SST (5) según los datos experimentales de RMN.

Esta inversión se observa mejor en la figura 3.16, donde se muestra el esqueleto simplificado de los péptidos 3 y 5, en el cual además de cambiar su posición de orientación respecto al esqueleto peptídico, en 5 la interacción es *face-to-face*.

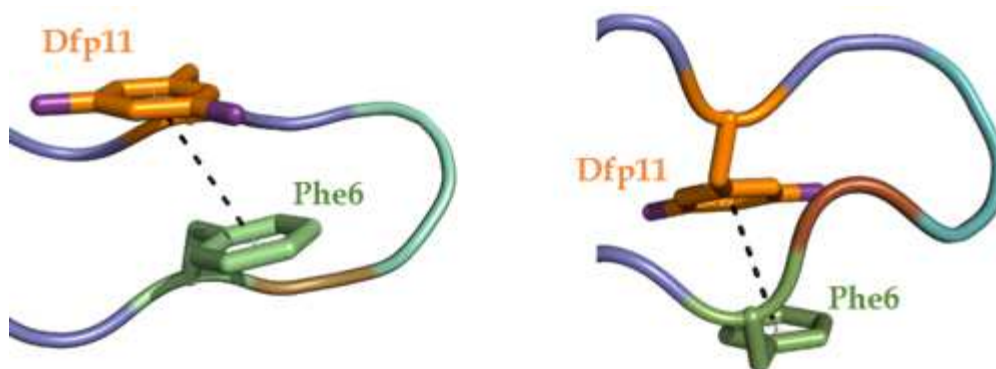


Figura 3.16. Comparación de la interacción Phe6-Dfp11 en 2 (izquierda) y 5 (derecha).

³¹ Principales señales NOE que satisfacen esta estructura: a) **H ϕ de Msa7** con H δ 21 y H δ 22 de Asn5. b) **H η de Msa7** con H δ 21 y H δ 22 de Asn5. c) **H ϵ de Msa7** con H α , H β 2, H β 3 y H δ 21 de Asn5; H β y H γ de Thr10; H α de Phe11; H γ de Thr12. d) **H δ de Dfp11** con H δ , H ϵ y H ζ de Phe6. e) **H ζ de Dfp11** con H ϵ de Phe6. Señales NOE que no satisfacen esta estructura: a) **H ϕ de Msa7** con H δ y H ϵ de Phe6; H δ 1 de D-Trp8. b) **H η de Msa7** con H ϵ de Phe6; H δ 1 de D-Trp8.

Este efecto ha de ser mediado por la presencia de la Msa en posición 7. La posición que ocupa el anillo mesitilo en la molécula empujaría al par hacia esta orientación concreta, que podría ser alimentado con interacciones laterales que el Dfp11 mediase. En la figura 3.17, se muestran las fuertes interacciones NOE entre los protones grupos metilo del anillo aromático, con los H γ terminales de ambas treoninas del derivado.

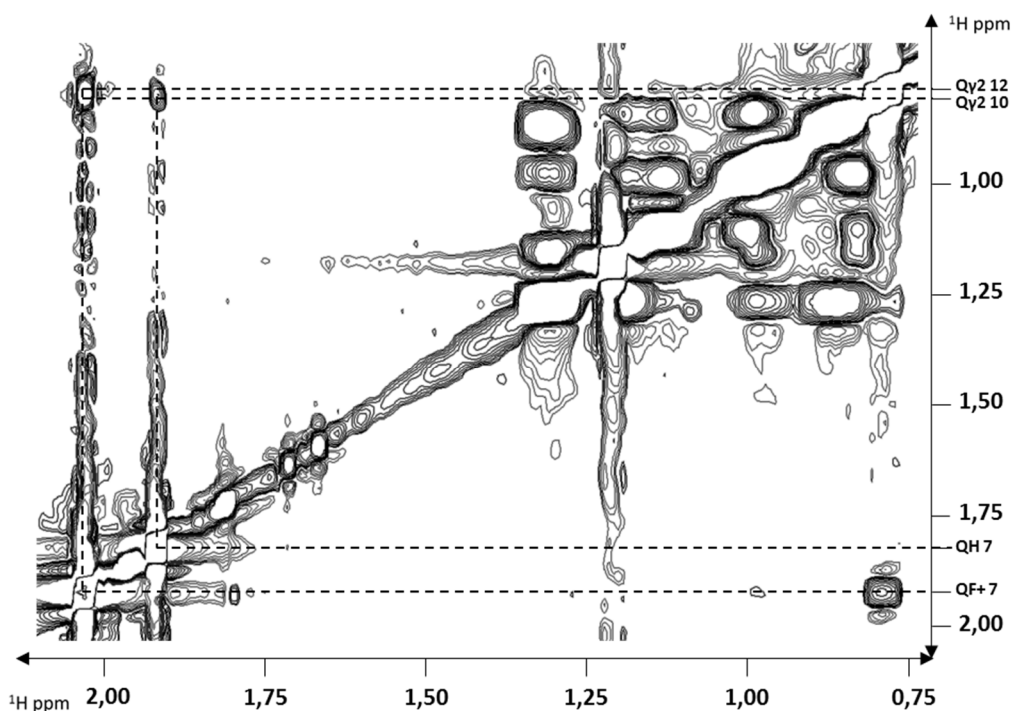


Figura 3.17. Ampliación del espectro NOESY 350 ms del análogo [L-Dfp11_L-Msa7_D-Trp8]-SST (5) en donde se muestran las interacciones de los H q metílicos con los H γ de Thr10 y Thr12, así como los H η de Msa7 con los H γ de Thr12.

3.5.6. Análogo [L-Dfp6,11_L-Msa7_D-Trp8]-SST (6).

Además, determinamos el efecto que tendrían dos difluorofenilos en las posiciones 6 y 11, sobre el esqueleto base L-Msa7_D-Trp8, dando lugar al derivado [L-Dfp6,11_L-Msa7_D-Trp8]-SST (6), cuyas estructuras más estables se muestran en la figura 3.18.³² Se trata de una conformación definida

³² Principales señales NOE que satisfacen esta estructura: a) **H q de Msa7** con H δ 21 y H δ 22 de Asn5; H δ 1 de D-Trp8. b) **H ϵ de Msa7** con H β 2, H β 3 y H δ 21 de Asn5; H γ de Thr10; H γ de Thr12. c) **H δ de Dfp11** con H β 2 y H β 3 de Dfp11. d) **H δ de Dfp6** con H β 2 de Dfp11.

Señales NOE que no satisfacen esta estructura: a) **H q de Msa7** con H ϵ 3 de D-Trp8. b) **H η de Msa7** con H δ 21 y H δ 22 de Asn5.

mayoritariamente rígida, en donde ambos restos Dfp tienen un margen variable de posiciones en el espacio, pero que mantienen una interacción de tipo *face-to-face*. Esta variabilidad es consecuencia de la disminución de información obtenida en el espectro, dado que se pierden las señales que corresponderían a los H α aromáticos de cada uno de ellos. En este caso, la cercanía espacial está más marcada debido al carácter electrón-pobre de ambos anillos, que potencia la interacción π - π al minimizar la repulsión entre ambos anillos.^{26,27,33} Hacia la misma cara, se orienta el par D-Trp8_Lys9, de nuevo bien resueltos.

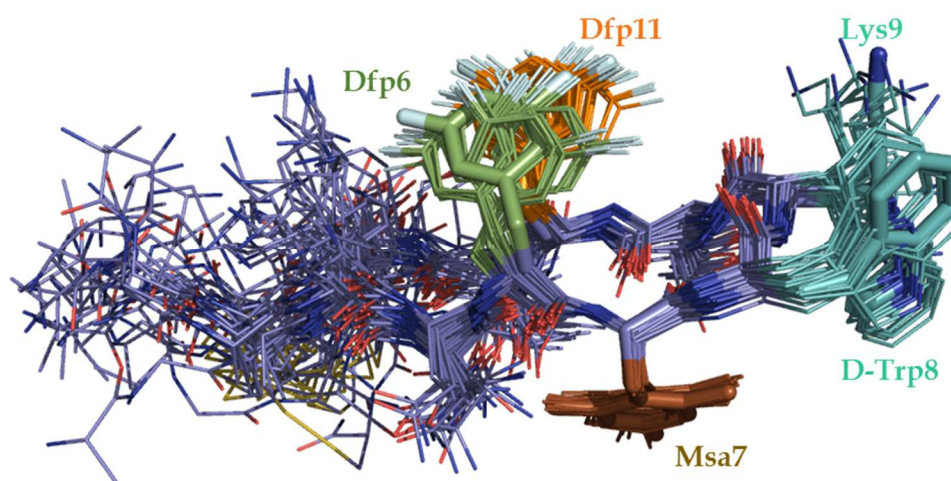


Figura 3.18. Superposición de las 25 estructuras de menor energía de [L-Dfp6,11_L-Msa7_D-Trp8]-SST (6) según los datos experimentales de RMN.

La Msa7 se dispone, siguiendo el comportamiento habitual, en la cara contraria del péptido en una posición muy rígida. Al contrario que en los análogos 4 y 5, cuyo resto mesitilo se orienta siguiendo la dirección del esqueleto peptídico, éste es uno de los pocos casos en los que el anillo se orienta perpendicularmente respecto a la cadena de aminoácidos, debido a la baja cantidad de señales NOE de los H η con otros protones de la estructura.

3.5.7. Discusión.

Al igual que ocurría al sustituir las fenilalaninas por L-mesitilalanina, los péptidos presentados en este capítulo alcanzan una estructura mayoritaria de

³³ S. L. Cockroft, J. Perkins, C. Zonta, H. Adams, S. E. Spey, C. M. R. Low, J. G. Vinter, K. R. Lawson, C. J. Urch, C. A. Hunter, *Org. Biomol. Chem.*, **2007**, *5*, 1062-1080.

mayor o menor rigidez en disolución, según demuestran los estudios espectroscópicos, cuando es un anillo de difluorofenilo el que está presente. Esto significa que también los anillos pobres en electrones son capaces de restringir la estructura de los péptidos, mediante un aumento de las interacciones π - π aromáticas. En el caso de la Dfp estas interacciones se verían favorecidas, además, por el aumento de la hidrofobicidad del anillo, así como del momento cuadrupolar que presentan gracias a ambos flúores en su estructura.

De las estructuras estudiadas, **1**, **3**, **4**, **5** y **6** presentan una disposición tridimensional en la cual los aminoácidos 6 y 11 quedan enfrentados a un lado del péptido, mediante acercamientos de tipo *face-to-face* u *offset-stacked*, y el aminoácido aromático en posición 7 queda colocado en la cara contraria. En todos ellos destaca su perfil de unión con SSTR2, que supera al octreótido, pero es **3** quien alcanza valores cercanos a la SST. Debido a la variabilidad en cuanto a la orientación relativa del dúo 6-11 respecto al resto de la molécula, así como el tipo de interacción que se da entre ambos residuos, se descarta que el perfil de unión con SSTR2 dependa únicamente de la potencia con la que se da la interacción aromática, teoría planteada anteriormente en nuestro grupo, teniendo que intervenir, además, otros factores.

El derivado **2** destaca por formar una estructura tipo clúster, gracias a la presencia de Dfp7, debido a la tendencia favorable por parte de su anillo a crear interacciones aromáticas. En los derivados de L-mesitilalanina estudiados en nuestro grupo,^{11a} esta arquitectura era alcanzada cuando Msa era ubicada en la sexta posición. Con esta estructura, una vez más, se llega a una unión favorable con SSTR3 (ver tablas 3.2 y 2.4).

Aunque todos estos derivados acusan una pérdida de afinidad con SSTR4, esta disminución de actividad para con este receptor se potencia en los análogos **4**, **5** y **6**, con L-mesitilalanina en posición siete en la secuencia. Además, parece que la Msa7 favorece también una pérdida de afinidad con SSTR5, lo que coincidiría con los datos de afinidad obtenidos para el análogo [L-Msa7_D-Trp8]-SST (ver tabla 2.4). Esto podría significar que, si bien la presencia de Msa7 no

asegura una alta afinidad por SSTR2, mejora el perfil de selectividad al dificultar la unión con SSTR4 y 5.

3.6. Conclusiones.

Los anillos de L- β -3',5'-difluorofenilalanina, de marcada pobreza electrónica y elevada hidrofobicidad, favorecen la restricción conformacional en disolución acuosa de los análogos tetrapeptídicos de somatostatina resultantes. A causa de la disminución de densidad electrónica en su nube π , unido a su momento cuadrupolar único y simétrico, las interacciones aromáticas resultantes se ven favorecidas, siguiendo una orientación de tipo *face-to-face* u *offset-stacked*.

La sustitución de la fenilalanina en posición 7 por un aminoácido pobre en electrones favorece la formación de una estructura de tipo clúster, tal como demuestra el análogo [L-Dfp7_D-Trp8]-SST **2**. Sería una situación paralela a la ocurrida con [L-Msa6_D-Trp8]-SST, donde el anillo rico en electrones en posición 6 favorece dicha arquitectura, con la cual se favorece, a su vez, la afinidad por SSTR3.

Si bien todos los derivados estudiados en este capítulo superan el valor de K_i por SSTR2 del octreótido, sólo [L-Dfp11_D-Trp8]-SST **3** logra alcanzar el orden de magnitud de la somatostatina. Así, la inclusión de Msa7 no asegura que la afinidad por SSTR2 vaya a verse incrementada. Sin embargo, al incluir la Msa en la séptima posición de la secuencia, tal como pasaba en el péptido [L-Msa7_D-Trp8]-SST, la afinidad por SSTR4 y SSTR5 disminuye notablemente, lo que mejora el perfil de selectividad de estos análogos.

Capítulo IV.

Análogos de somatostatina con L-3'Pya-OH.

4.1 Introducción.

La L-3-(3'-piridil)alanina, L-β-3'-piridilalanina, L-3'Pya-OH, 3'Pya o Pal, es un aminoácido no natural usado en la literatura para sustituir a los aminoácidos naturales fenilalanina, tirosina e histidina (figura 4.1). El uso en sistemas biológicos tanto del enantiómero L como del D, así como los correspondientes isómeros con el nitrógeno en posición 4 (4'Pya), lleva siendo estudiado desde hace varias décadas.¹

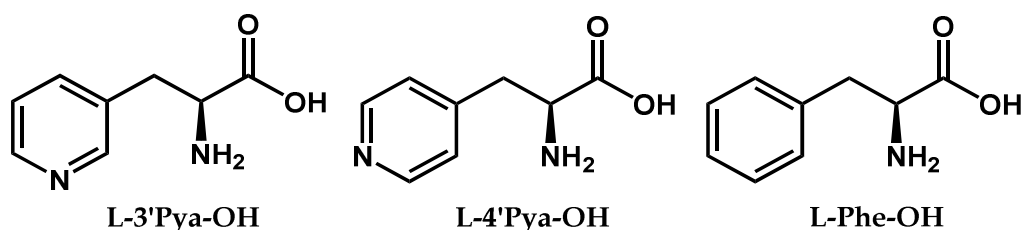


Figura 4.1. Estructura de la 3'Pya y 4'Pya en comparación a su análogo natural Phe.

Por ejemplo, las piridilalaninas han demostrado su capacidad como sustratos enzimáticos, dado que son antagonistas a la fenilalanina,² y además son capaces de inhibir a la histidina descarboxilasa.³

Destaca su uso como sustitutas en secuencias peptídicas con el fin de obtener análogos más potentes. Entre los distintos ejemplos que hay descritos en la bibliografía, destaca el uso de las piridilalaninas en fármacos antiovulatorios, mediante una acción antagonista a la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH de sus siglas en inglés *Gonadotropin-Releasing Hormone*, o LHRH de *Luteinizing Hormone-Releasing Hormone*), donde la 3'Pya sobresale respecto a 2'Pya y 4'Pya.⁴ También han servido para elaborar análogos de vasopresina,⁵

¹ a) D. C. Roberts, F. Vellaccio, *Peptides*, **1983**, 5, 341-449; b) M. J. Wilson, D. L. Hatfield, *Biochim. Biophys. Acta*, **1984**, 781, 205-215; c) P. J. Lea, R. D. Norris, *Phytochemistry*, **1976**, 15, 585-595.

² P. T. Sullivan, M. Kester, S. J. Norton, *J. Med. Chem.*, **1968**, 11, 1172-1176.

³ a) G. W. Chang, E. E. Snell, *Biochemistry*, **1968**, 7, 2005-2012; b) S. Tanase, B. M. Guirard, E. E. Snell, *J. Biol. Chem.* **1985**, 260, 6738-6746.

⁴ a) K. Folkers, C. Y. Bowers, T. M. Kubiak, J. Stepinski, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1983**, 111, 1089-1095; b) K. Folkers, C. Y. Bowers, T. M. Kubiak, J. Stepinski, U.S. Patent, **1985**, 4,504,414; c) J. E. Rivier, J. Porter, C. L. Rivier, M. Perrin, A. Corrigan, W. A. Hook, R. P. Siraganian, W. W. Vale, *J. Med. Chem.*, **1986**, 29, 1846-51.

⁵ M. Sobocinska, I. Derdowska, J. Schwartz, G. Kupryszewski, *Peptides*, **1995**, 16, 389-393.

angiotensina II⁶ o ribonucleasas,⁷ así como fármacos antiinflamatorios⁸ y antibacterianos,⁹ entre otros ejemplos.

Incluso se han usado en análogos octapeptídicos de somatostatina. Coy y colaboradores¹⁰ descubrieron el potencial que tenía la 3'Pya cuando, de entre las decenas de péptidos que sintetizaron, determinaron que el péptido Nal-c[D-Cys_3'Pya_D-Trp_Lys_Val_Cys]-Nal-NH₂ tenía una elevada potencia como inhibidor del SSTR2, hecho que se siguió explotando y explorando.¹¹ Posteriormente, se descubrió cómo variaciones de la secuencia octapeptídica que incluía la 3'Pya en su posición 3 presentaban competencia como antagonistas del receptor de urotensina II,¹² o incrementando la actividad en los péptidos conocidos como DOTA-octreótidos, usados como radioligandos en tratamientos de radioterapia.¹³

Sin embargo, ni la 3'Pya así como tampoco la 4'Pya han sido probadas en péptidos de catorce residuos. Lo más similar que se ha hecho en este sentido es el trabajo de Hirschmann,¹⁴ uno de los pocos trabajos de investigación en los que se trabaja con la secuencia de catorce residuos de somatostatina: en su

⁶ K. Heieh, E. C. Jorgensen, *J. Med. Chem.*, **1979**, 22, 1199-1206.

⁷ a) O. D. Van Batenburg, I. Voskuyl-Holtcamp, C. Schattenkerk, K. Hoes, K. E. T. Kerling, E. Havinga, *Biochem. J.*, **1977**, 163, 385-387; b) C. Hoes, J. Flaap, W. Bloemhoff, K. E. T. Kerliig, *Recl. Trau.Chim. Pays-Bas*, **1980**, 99, 99.

⁸ H. Shimeno, S. Soeda, A. Nagamatsu, *Chem. Pharm. Bull.*, **1977**, 25, 2983-2987.

⁹ a) Japan Patent JP 60/130591 A2, **1985**; b) European Patent EP 98609/A2, **1984**.

¹⁰ S. J. Hocart, R. Jain, W. A. Murphy, J. E. Taylor, B. Morgan, D. H. Coy, *J. Med. Chem.*, **1998**, 41, 1146-1154.

¹¹ a) W. J. Rossowski, B.-L. Cheng, N.-Y. Jiang, D. H. Coy, *Br. J. Pharmacol.*, **1998**, 125, 1081-1087; b) S. J. Hocart, R. Jain, W. A. Murphy, J. E. Taylor, D. H. Coy, *J. Med. Chem.*, **1999**, 42, 1863-1871; c) V. Fykse, D. H. Coy, H. L. Waldum, A. K. Sandvik, *Br. J. Pharmacol.*, **2005**, 144, 416-421; d) L. Piqueras, Y. Tache, V. Martínez, *J. Physiol.*, **2003**, 549, 889-901.

¹² D. J. Behm, C. L. Herold, E. H. Ohlstein, S. D. Knight, D. Dhanak, S. A. Douglas, *Br. J. Pharmacol.*, **2002**, 137, 449-458.

¹³ a) J. S. Schmitt, D. Wild, M. Ginj, J. C. Reubi, B. Waser, M. de Jong, B. F. Bernard, E. P. Krenning, H. R. Macke, *Labelled Cpd. Radiopharm.*, **2001**, 44, 697-699; b) M. Ginj, J. S. Schmitt, J. Chen, B. Waser, J.-C. Reubi, M. de Jong, S. Schulz, H. R. Maecke, *Chemistry & Biology*, **2006**, 13, 1081-1090.

¹⁴ S. Neelamkavil, B. Arison, E. Birzin, J. Feng, K. Chen, A. Lin, F. Cheng, L. Taylor, E. R. Thornton, A. B. Smith III, R. Hirschmann, *J. Med. Chem.*, **2005**, 48, 4025-4030.

investigación, sintetizaron tres análogos de SST, los cuales contenían en su estructura el aminoácido no natural L-pirazinilalanina (Pyz) (figura 4.2) en posiciones 6, 7 u 11, en todos los casos acompañado de la sustitución de L-Trp8 por su enantiómero D.

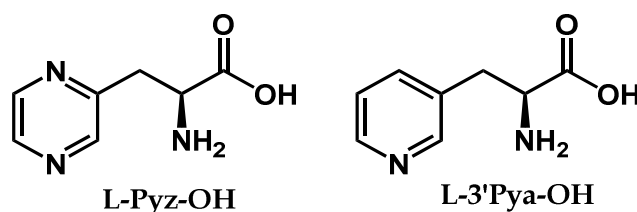


Figura 4.2. Estructura del L-Pyz-OH (izquierda), comparada con la de L-3'Pya-OH (derecha).

Los estudios que llevaron a cabo vieron que tanto [L-Pyz6_D-Trp8]-SST como [L-Pyz11_D-Trp8]-SST tenían una afinidad similar por SSTR2 y 4, sugiriendo un tipo de interacción π - π entre anillos similar, a la vez que concluían que el anillo aromático Pyz en posición 6, al decrecer en intensidad electrónica, disminuía más la K_i con SSTR2 en comparación con el derivado con Pyz11. Esto coincidiría con el postulado de Lewis *et al.*¹⁵ cuando llevaron a cabo el análisis de sustitución sistemática de aminoácidos por alanina (*Ala-scan*): la pérdida de actividad se acentuaba más cuando Phe6 en SST14 era sustituido por Ala que en el caso de Phe11, por tanto el péptido habría de interactuar con el SSTR2 gracias a una donación π de densidades electrónicas desde el anillo del sexto residuo. Sin embargo, para aumentar la afinidad no bastaría con disponer de un anillo rico en electrones en dicha posición, ya que como se vio en el caso de la [L-Msa6_D-Trp8]-SST, la cual forma un clúster (figura 2.10),¹⁶ la conformación tridimensional también es un factor a tener en cuenta.

En nuestro caso, decidimos investigar la 3'Pya y a la 4'Pya en sus respectivos papeles como aminoácidos no naturales sustituyentes de las

¹⁵ I. Lewis, W. Bauer, R. Albert, N. Chandramouli, J. Pless, G. Weckbecker, C. Bruns, *J. Med. Chem.*, **2003**, *46*, 2334-2344.

¹⁶ a) P. A. Martín-Gago, tesis doctoral *Synthesis of highly structured and receptor-selective tetradecapeptidic analogs of somatostatin: Fine-tuning the non-covalent interactions among their aromatic residues*, Universidad de Barcelona, 2013; b) P. Martín-Gago, M. Gómez-Caminals, R. Ramón, X. Verdager, P. Martín-Malpartida, E. Aragón, J. Fernández-Carneado, B. Ponsati, P. López-Ruiz, M. A. Cortés, B. Colás, M. J. Macías, A. Riera, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2012**, *51*, 1820-1825.

fenilalaninas de la secuencia nativa. Tal como ocurría con la difluorofenilalanina, la 3'-piridilalanina concurre en una pobreza electrónica anular en comparación con la fenilalanina, pero la distribución de la densidad electrónica en dichos aminoácidos no naturales difiere, en tanto la Dfp presenta un momento cuadrupolar ausente en la 3'Pya (figura 4.3). Además, la presencia del nitrógeno cambia el componente hidrofóbico del anillo: el logP del anillo de 3'Pya es de 1,18, mucho más hidrófilo que Dfp (logP = 2,84) y que Phe (logP = 2,52).

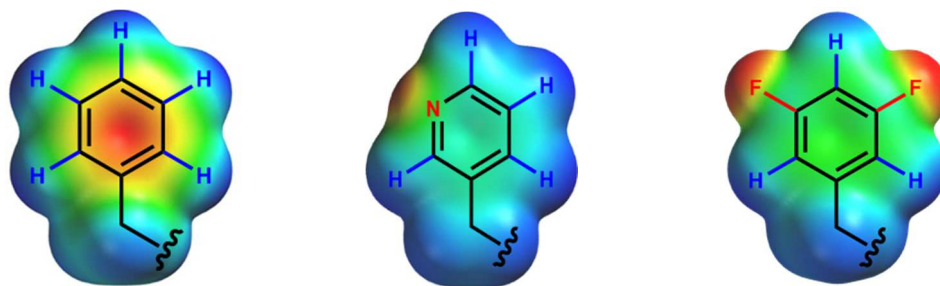


Figura 4.3. Densidades electrónicas comparadas entre el anillo fenilo de la Phe (izquierda), el 3'piridilo de la 3'Pya (centro) y el 3',5'difluorofenilo de la Dfp (derecha). Azul = densidad electrónica baja. Rojo = densidad electrónica alta. Cálculo en Spartan (semi-empírico AM1).¹⁷

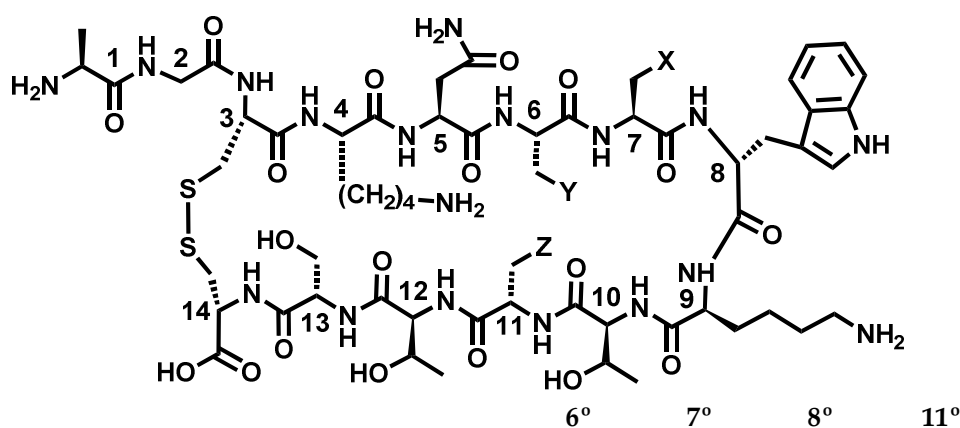
Ha quedado demostrado cómo la Dfp provoca restricciones conformacionales distintas en función de la posición que ocupa, lo que a su vez se traduce en un espectro de afinidad por los SSTR diferente. Saber cómo afecta a la estructura y a la actividad el uso del anillo pobre en electrones de la 3'Pya, distinto a la Dfp en cuanto a hidrofilia y al reparto de densidad electrónica, nos permitirá ahondar en el estudio de la somatostatina en su forma tetradecapeptídica y su respuesta a la incorporación de estos nuevos aminoácidos no naturales. Por ello, en este capítulo se abordará la síntesis, estudio estructural y determinación de la actividad biológica de derivados de SST14 que incluyan L-β-3'-piridilalanina.

4.2. Síntesis de análogos de somatostatina con L-β-3'-piridilalanina.

El diseño de análogos se llevó a cabo usando la misma aproximación que con los derivados de Dfp descritos previamente en el capítulo III (tabla 4.1). La

¹⁷ Spartan '10 v. 1.1.0 (Wavefunction).

3'Pya fue incluida en posiciones 6, 7 u 11 para dar respectivamente los péptidos 7, 8 y 9, cubriendo de manera individual todas las posibles monosustituciones de fenilalanina, con el D-Trp8 incluido como sustitución fija, al aumentar la semivida plasmática sin afectar al perfil de afinidad, además de aumentar sutilmente la rigidez de la estructura debido a la mayor interacción del D-Trp8 con la L-Lys9.¹⁸ Por la restricción que impone la Msa en la estructura del péptido [L-Msa7_D-Trp8]-SST (figura 2.11), al tiempo que potencia la actividad en SSTR2,¹⁶ se sintetizaron dos secuencias con el par Msa7_D-Trp8, una con 3'Pya6 y la segunda con 3'Pya11, correspondiendo a los análogos 10 y 11. De esta manera, se corroborará el efecto que estos anillos piridilos tienen sobre la estructura tridimensional y la actividad, y que sirvan como comparación a lo estudiado en Dfps.



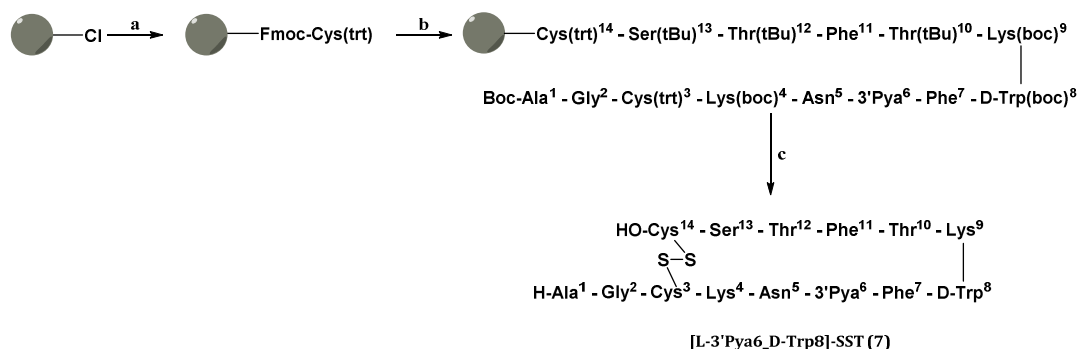
	6°	7°	8°	11°
[L-3'Pya6_D-Trp8]-SST (7)	3'Pya	Phe	D-Trp	Phe
[L-3'Pya7_D-Trp8]-SST (8)	Phe	3'Pya	D-Trp	Phe
[L-3'Pya11_D-Trp8]-SST (9)	Phe	Phe	D-Trp	3'Pya
[L-3'Pya6_L-Msa7_D-Trp8]-SST (10)	3'Pya	Msa	D-Trp	Phe
[L-3'Pya11_L-Msa7_D-Trp8]-SST (11)	Phe	Msa	D-Trp	3'Pya

Tabla 4.1. Derivados de somatostatina con 3'Pya presentados en este capítulo.

La Fmoc-L-3'-piridilalanina es un aminoácido comercial. La Fmoc-L-mesitilalanina (Msa) fue sintetizada según los métodos previamente descritos

¹⁸ a) G. Garcia-Tsao, A. J. Sanyal, N. D. Grace, W. Carey, *Hepatology*, **2007**, *46*, 922-938; b) D. F. Veber, F. W. Holly, W. J. Paleveda, R. F. Nutt, S. J. Bergstrand, M. Torchiana, M. S. Glitzer, R. Saperstein, R. Hirschmann, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1978**, *75*, 2636-2640; c) J. Rivier, M. Brown, W. Vale, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1975**, *65*, 746-751; d) B. H. Arison, R. Hirschmann, D. F. Veber, *Bioorg. Chem.*, **1978**, *7*, 447-451; e) O. Ovadia, S. Greenberg, B. Laufer, C. Gilon, A. Hoffman, H. Kessler, *Expert Opin. Drug Discovery*, **2010**, *5*, 655-671.

por nuestro grupo.¹⁶ Todos los péptidos expuestos en este capítulo se sintetizaron en fase sólida, usando la estrategia Fmoc/^tBu en resina 2-clorotritil cloruro (esquema 4.1).¹⁹



Esquema 4.1. Ejemplo de síntesis, péptido 7. a) 1. Fmoc-L-Cys(trt)-OH (3 eq), DIEA (3 eq), 2. MeOH; b) 1. Piperidina 20% DMF, 2. Fmoc-Aaa-OH (1.5–3 eq), DIPCDI (3 eq), HOBT (3 eq), DMF (x12), 3. Piperidina 20% DMF, 4. Boc-Ala-OH, DIPCDI (3 eq), HOBT (3 eq), DMF; c) 1. CH₂Cl₂/TFE/AcOH, 2. I₂, 3. TFA/CH₂Cl₂/anisol/H₂O.

Durante la síntesis del análogo **9** el acoplamiento del aminoácido L-Asn-OH en posición 5 fue problemático, lo cual hizo necesario el reacoplamiento de este residuo. Esta dificultad también se había observado previamente en la síntesis de [L-Pyz11_D-Trp8]-SST, en el trabajo de Hirschmann.¹⁴

4.3. Ensayos biológicos.

Fueron determinados para todos los derivados sintetizados perfiles de actividad biológica frente a SSTR1-5. Como con los Dfps, la base de estos ensayos es el trabajo de Rens-Domiano *et al.*²⁰ Mediante el uso de membranas celulares aisladas de la línea celular CHO-K1 que expresan receptores de somatostatina clonados, se determina el K_i de cada uno de estos péptidos mediante el desplazamiento de [¹²⁵I-Tyr11]-SST, previamente incubada con cada uno de los receptores. Estas determinaciones fueron llevadas a cabo externamente por la compañía Eurofins Scientific.²¹

¹⁹ G. B. Fields, R. L. Noble, *Int. J. Protein Res.*, **1990**, *35*, 161-214.

²⁰ S. Rens-Domiano, S. F. Law, Y. Yamada, S. Seino, G. I. Bell, T. Reisine, *Mol. Pharmacol.*, **1992**, *42*, 28-34.

²¹ Eurofins Panlabs Inc., de Eurofins Scientific.

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 4.2, usando como valores control de K_i los dados por SST14 y octreótido, medidos parejamente con los análogos. Destaca la afinidad que los péptidos **7**, **8**, **9** y **11** muestran por SSTR1, de los cuales **7** y **8**, además, tienen el mismo orden de afinidad con SSTR4 que el que presenta la SST14. A su vez, el mismo derivado **8** alcanza una K_i con SSTR3 afín a su homólogo [L-Dfp7_D-Trp8]-SST (**2**). Aunque los cinco péptidos de esta familia alcanzan valores de K_i similares al presentado por el octreótido para SSTR2, **11** lo supera, alcanzando el mismo orden de magnitud de unión que SST.

	SSTR1 (nM)	SSTR2 (nM)	SSTR3 (nM)	SSTR4 (nM)	SSTR5 (nM)
SST14	1,88	0,016	0,25	1,55	0,76
Octreótido	480	0,77	13,0	>1000	21,0
[L-3'Pya6_D-Trp8]-SST (7)	9,57	0,74	3,10	6,62	4,19
[L-3'Pya7_D-Trp8]-SST (8)	8,14	0,29	0,70	4,49	2,44
[L-3'Pya11_D-Trp8]-SST (9)	6,43	0,14	1,65	11,5	2,84
[L-3'Pya6_L-Msa7_D-Trp8]-SST (10)	14,0	0,30	11,8	70,0	56,0
[L-3'Pya11_L-Msa7_D-Trp8]-SST (11)	3,97	0,068	6,68	31,0	10,2

Tabla 4.2. Datos de afinidad frente a los SSTR1-5. En negrita, valores de K_i que se encuentran en el mismo orden de magnitud que el que presenta la SST14.

Para tratar de elucidar un posible patrón común de comportamiento entre esta familia de péptidos y la familia de la 3',5'-difluorofenilalanina, se volverá sobre estos resultados una vez analizadas las estructuras de estos péptidos.

4.4. Estructura.

Los cinco derivados sintetizados fueron estudiados mediante técnicas espectroscópicas de RMN en agua tamponada a pH = 6,5 en presencia de un 10% de agua deuterada, con las que se obtuvo sus respectivos espectros homonucleares monodimensionales y bidimensionales ^1H - ^1H TOCSY y NOESY.²² El procedimiento seguido fue el descrito en el punto 3.4 de la presente tesis doctoral. Al identificar los correspondientes NOEs e integrarlos, los

²² Misma metodología que Pablo Martín-Gago *et al.* (16b) y K. Wuethrich, G. Wider, G. Wagner, W. Braun, *J. Mol. Biol.*, **1982**, 155, 311-319.

volúmenes de pico obtenidos fueron introducidos en el programa de cálculo CNS²³ mediante la interfaz StrutCalc,²⁴ lanzando un número variable de cálculos, hasta que las estructuras de menor energía fuesen coherentes con los datos espectrales, mostrasen convergencia y no incurriesen en violación de ángulos diedros según los diagramas de Ramachandran.²⁵ En todos los casos, se pudo determinar una estructura mayoritaria.

De nuevo se confirma que la inclusión del D-Trp en posición 8, aumenta la interacción alifática-aromática del par D-Trp8_L-Lys9, lo que se traduce en un elevado apantallamiento de los H γ de la Lys9. Conviene señalar que se sintetizaron a modo de control los análogos [L-3'Pya6]-SST y [L-3'Pya11]-SST como péptidos control (no incluidos en esta tesis). Dichos derivados no presentan una estructura mayoritaria en disolución; debido a la ausencia de señales NOE en sus respectivos espectros bidimensionales TOCSY y NOESY es de suponer que presentan una elevada flexibilidad conformacional tal como presenta la hormona nativa. Esto aumenta la importancia de la estabilización inducida por el D-Trp8; como ya se ha comentado permite enriquecer en un confórmero la familia de estructuras del derivado de SST. Así, aunque el uso de anillos pobres en electrones no es suficiente para dar una conformación mayoritaria, al combinarse con el efecto provocado por el par D-Trp8_Lys9 permite calcular los confórmeros mayoritarios.

La 3'Pya representa una ventaja para la asignación de espectros bidimensionales: mientras que los H_{AR} de las fenilalaninas aparecen en los espectros con un limitado margen de diferencia de desplazamiento químico, los cuatro protones aromáticos de la 3'Pya no son equivalentes y, además, la presencia del N_{AR} disminuye su apantallamiento, por lo que salen más desplazados que sus homólogos de fenilalanina. De esta manera, se obtiene una

²³ A. T. Brünger, P. D. Adams, G. M. Clore, W. L. DeLano, P. Gros, R. W. Grosse-Kunstleve, J. S. Jiang, J. Kuszewski, M. Nilges, N. S. Pannu, R. J. Read, L. M. Rice, T. Simonson, G. L. Warren *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **1998**, *54*, 905-921.

²⁴ P. Martín-Malpartida, M. J. Macías, datos sin publicar.

²⁵ G. N. Ramachandran, C. Ramakrishnan, V. Sasisekharan, *J. Mol. Biol.*, **1963**, *7*, 95-99.

mayor información de las interacciones aromáticas presentes en la molécula que en el caso de los análogos con los $H\delta_{AR}$ de la Dfp.

La inclusión de mesitilalanina, con sus tres grupos metilo unidos al anillo, ayuda, una vez más, a estabilizar la molécula mediante interacciones aromáticas directas e indirectas dando un mayor nivel de ordenación. La densidad de señales de sus nueve protones $C_{AR}-CH_3$, junto a los dos $H\epsilon$ muy apantallados, aportan a los espectros un mayor número de NOEs entre protones y, por tanto, de restricciones para el cálculo de la conformación predominante.

4.4.1. Análogo [L-3'Pya6_D-Trp8]-SST (7).

El primer derivado estudiado en esta familia, [L-3'Pya6_D-Trp8]-SST (7), presenta una gran convergencia de conformaciones de menor energía (figura 4.4).²⁶ Estas conformaciones se definen por la presencia de los anillos aromáticos 3'Pya6 y Phe11 en una interacción *edge-to-face*. En ellas, los $H\delta$ y el $H\epsilon$ de Phe11, se aproximan a la cara de 3'Pya por el extremo donde se encuentra el N_{AR} , que corresponde a la zona de mayor densidad electrónica de este aminoácido no natural.

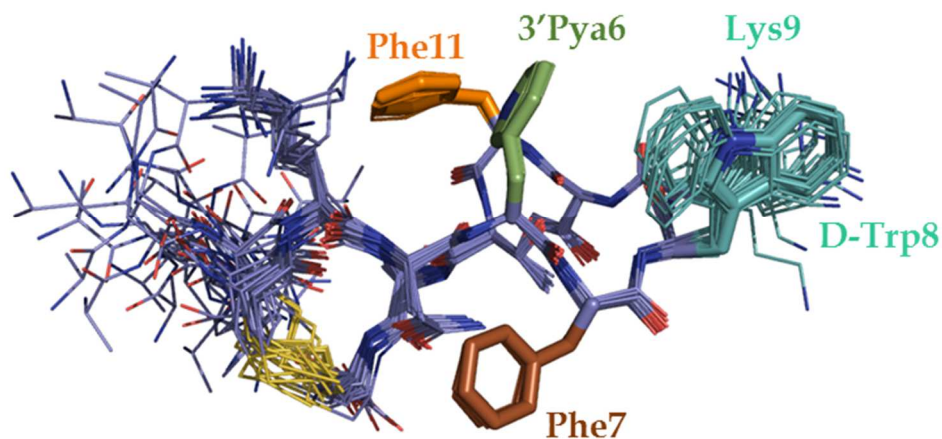


Figura 4.4. Superposición de las 25 estructuras de menor energía de [L-3'Pya6_D-Trp8]-SST (7) según los datos experimentales de RMN.

²⁶ Principales señales NOE que satisfacen esta estructura: a) **$H\delta$ de Phe7** con $H\beta_2$ de Asn5; $H\gamma$ de Thr10; $H\alpha$ y $H\gamma$ de Thr12. b) **$H\epsilon$ de Phe7** con $H\beta_2$ de Asn5; $H\beta$ y $H\gamma$ de Thr12. c) **$H\zeta$ de Phe7** con $H\beta_2$ de Asn5; $H\gamma$ de Thr12. d) **$H\delta$ de Phe11** con HN , $H\delta_1$, $H\delta_2$ y $H\zeta$ de 3'Pya6. e) **$H\zeta$ de Phe11** con $H\delta_2$ y $H\zeta$ de 3'Pya6.

Señales NOE que no satisfacen esta estructura, detectadas en el espectro bidimensional: **$H\delta$ de Phe11** con $H\beta_2$ de Asn5; $H\beta_2$ de Phe7; $H\gamma$ de Thr10; $H\gamma$ de Thr12.

Al mismo tiempo, la Phe7 se dispone en la cara contraria del par aromático, de manera transversal al plano que cruza el esqueleto peptídico de este análogo, y acercándose al puente disulfuro. A pesar de la definición de este análogo, los rotámeros correspondientes al par de residuos D-Trp8 y Lys9 son amplios, a causa de la ausencia de NOEs entre esta región y el resto de la molécula. En cualquier caso, ambos aminoácidos se orientan hacia la misma cara del esqueleto donde se encuentra el par 3'Pya6-Phe11.

4.4.2. Análogo [L-3'Pya7_D-Trp8]-SST (8).

El péptido [L-3'Pya7_D-Trp8]-SST (8) presenta un elevado grado de convergencia entre sus estructuras de menor energía, tal como se muestra en la figura 4.5.²⁷

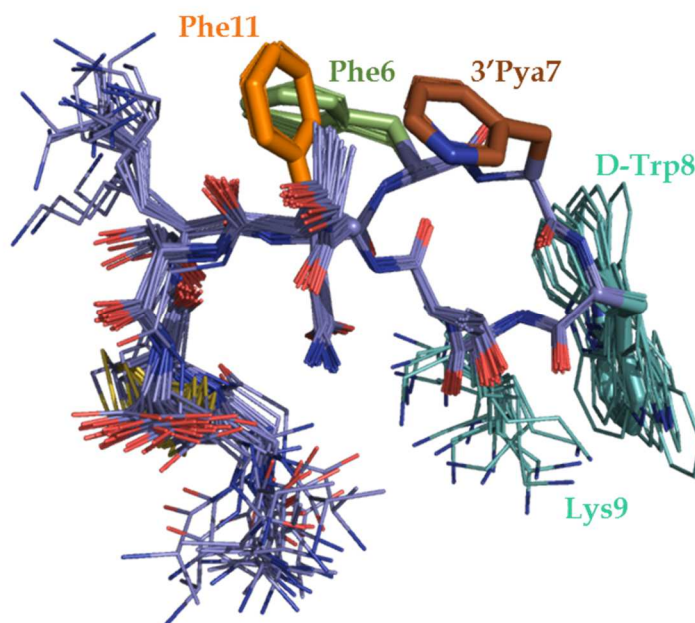


Figura 4.5. Superposición de las 25 estructuras de menor energía de [L-3'Pya7_D-Trp8]-SST (8) según los datos experimentales de RMN.

El rasgo más notorio en esta estructura es la formación de un clúster aromático en una de las caras del esqueleto peptídico, mediante interacciones de

²⁷ Principales señales NOE que satisfacen esta estructura: a) **H δ de Phe6** con H δ 1 y H δ 2 de 3'Pya7. b) **H ϵ de Phe6** con H ζ de 3'Pya7; H β 3 de Phe11. c) **H ϵ de Phe11** con H β 2 y H β 3 de Phe6; H δ 2 y H ζ de 3'Pya7. d) **H δ 2 de 3'Pya7** con H β 2 y H β 3 de Phe11.

Señales NOE que no satisfacen esta estructura: a) **H α de Phe6** con H δ 1 de D-Trp8. b) **H δ de Phe6** con H β 2 de D-Trp8. c) **H γ de Thr12** con H ϵ de 3'Pya7; H δ de Phe11.

los tres anillos aromáticos, Phe6, 3'Pya7 y Phe11, tal como se ve en sus espectros bidimensionales. Como ocurría en 7, D-Trp8_Lys9 acusan una “doble” disposición espacial, a pesar de la existencia de contactos con el resto de la cadena. Ampliando la región del núcleo de anillos aromáticos, se pueden confirmar diferencias respecto al que se crea en el homólogo 2 visto en el capítulo III de esta tesis (figura 4.6).

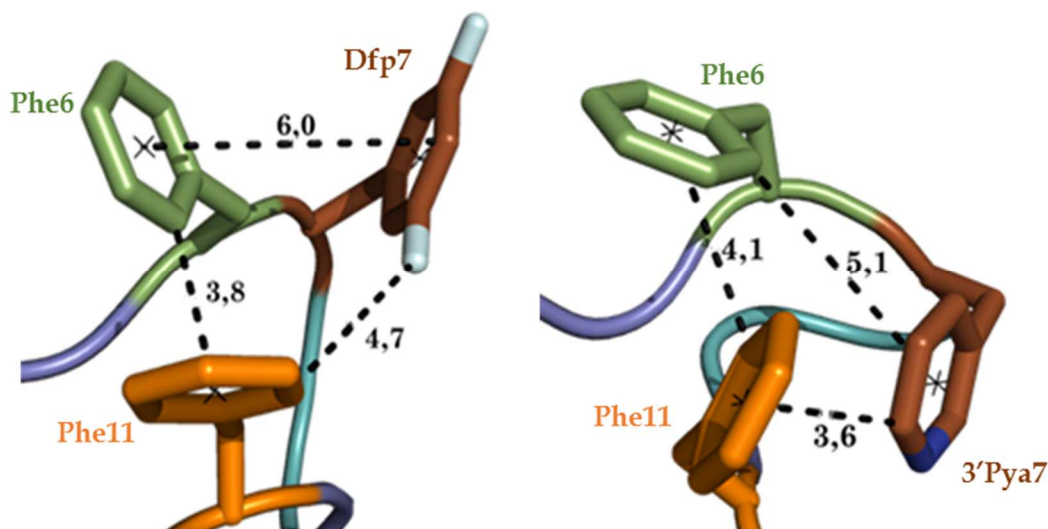


Figura 4.6. Comparación de los clúster formados entre [L-Dfp7_D-Trp8]-SST (2) (izquierda) y [L-3'Pya7_D-Trp8]-SST (8) (derecha). Distancias expresadas en Ångström (Å).

El péptido 8 crea una secuencia de interacciones *edge-to-face* entre los tres anillos, de forma que el H ζ de la 3'Pya7 se acerca a la nube π de Phe11, cuyo H δ se aproxima a la cara de elevada densidad electrónica de Phe6. Este círculo se cierra al comprobar que, aun a cierta distancia, el borde C-H de Phe11 se orienta hacia la nube π correspondiente a la 3'Pya7. Discrepa pues del clúster de 2, donde las Phe6 y 11 se enfrentan *edge-to-face* y la Dfp7 queda más ajena, *face-to-face* con el residuo 6 y aproximando su C-F de elevada densidad electrónica al borde de polaridad opuesta del anillo 11. Que se genere esta estructura tipo clúster puede deberse, como en el caso del péptido 2, a que las propiedades intrínsecas de 3'Pya favorezca las interacciones aromáticas con los otros dos anillos aromáticos.

4.4.3. Análogo [L-3'Pya11_D-Trp8]-SST (9).

Aunque el análogo [L-3'Pya11_D-Trp8]-SST (9) presente menor convergencia que los dos análogos anteriormente estudiados (figura 4.7), a causa

de la menor intensidad de señales en su espectro bidimensional, las estructuras calculadas de menor energía tienden a formar una estructura tridimensional²⁸ cuyos anillos 3'Pya11 y Phe6 quedan definidos dentro de una alineación de tipo *edge-to-face*, en donde el borde contrario a donde el N_{AR} se encuentra favorece una interacción CH- π con la nube electrónica del anillo en posición 6, a causa de las interacciones NOE de H δ 1 y H ϵ con el anillo fenilo. Como 7, la Phe7 se coloca en la cara contraria del par aromático 6-11, aunque esta vez disponga su cara π paralelamente a la dirección del esqueleto peptídico. El par D-Trp8_Lys9 se proyecta en la dirección del esqueleto peptídico, con una orientación más definida debido al acercamiento de los H β de D-Trp8 hacia los H δ aromáticos de Phe6, gracias a los cual se enfoca sutilmente hacia el doblete de anillos aromáticos enfrentados.

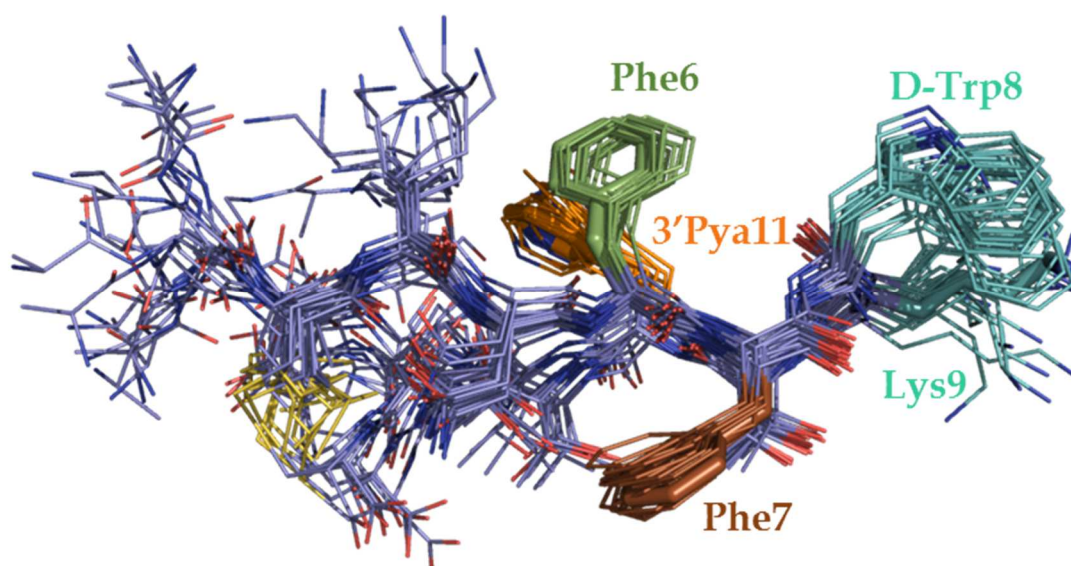


Figura 4.7. Superposición de las 25 estructuras de menor energía de [L-3'Pya11_D-Trp8]-SST (9) según los datos experimentales de RMN.

4.4.4. Análogo [L-3'Pya6_L-Msa7_D-Trp8]-SST (10).

El primero de los derivados de 3'Pya que incluye Msa7, esto es [L-3'Pya6_L-Msa7_D-Trp8]-SST (10), cuya estructura tridimensional mayoritaria se

²⁸ Principales señales NOE que satisfacen esta estructura: a) **H δ de Phe6** con H β 2 de D-Trp8; H δ 1 de 3'Pya11. b) **H ϵ de Phe6** con H β 2, H β 3, H δ 1 H ϵ y H ζ de 3'Pya11. c) **H δ de Phe7** con H γ de Thr10; H α y H β de Thr12. d) **H ϵ de Phe7** con H α de Asn5; H γ de Thr12. e) **H ζ de 3'Pya11** con H ζ de Phe6.

Señales NOE que no satisfacen esta estructura: a) **H δ de Phe7** con H β 2 de D-Trp8.

ofrece en la figura 4.8,²⁹ presenta una disposición espacial parecida a **9**. La Msa7 se coloca en clara analogía a Phe7 de **9**, con una fuerte interacción en sus espectros entre los protones metálicos H ϕ de Msa7 con Asn5, Thr10 y Thr12 (figura 4.9).

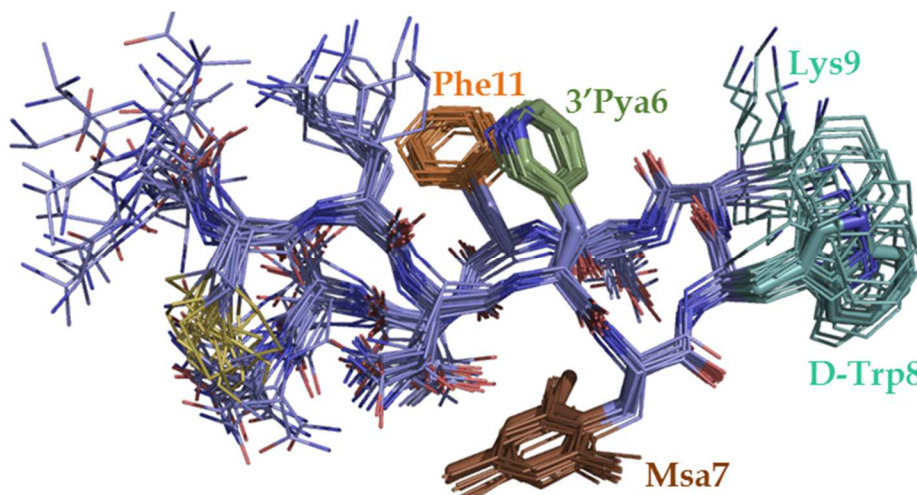


Figura 4.8. Superposición de las 25 estructuras de menor energía de [L-3'Pya6_L-Msa7_D-Trp8]-SST (**10**) según los datos experimentales de RMN.

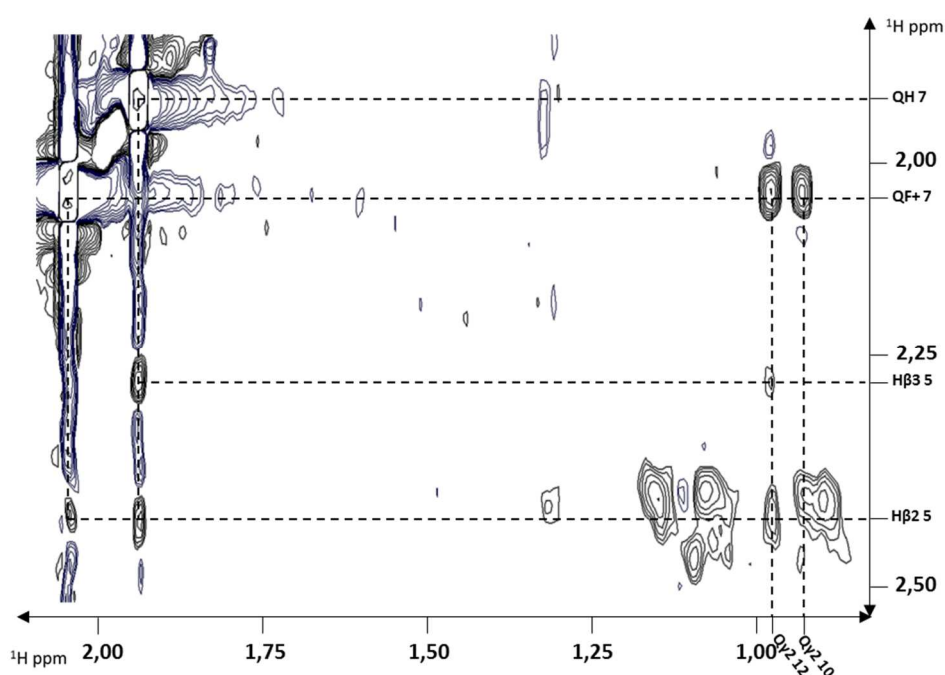


Figura 4.9. Ampliación del espectro NOESY 350 ms del análogo [L-3'Pya6_L-Msa7_D-Trp8]-SST (**10**). Interacciones de los H ϕ de Msa7 con los H γ de Thr10 y Thr12, así como los H β de Asn5 con los H γ de las treoninas y los protones metálicos de Msa7.

²⁹ Principales señales NOE que satisfacen esta estructura: a) **H ϕ de Msa7** con H δ 21 de Asn5. b) **H η de Msa7** con H δ 21 y H δ 22 de Asn5. c) **H ϵ de Msa7** con H β 2, H β 3 de Asn5; H α , H β y H γ de Thr12. d) **H δ de Phe11** con H β 2, H β 3, H δ 2, H ϵ y H ζ de 3'Pya6.

Señales NOE que no satisfacen esta estructura: a) **H ϕ de Msa7** con H δ 1 y H δ 2 de Phe6; H ϵ 3 de D-Trp8.

El anillo 6 (en este caso de 3'Pya) ofrece densidad de su nube π al C-H δ de Phe11, orientados nuevamente en una geometría *edge-to-face*. Centrando la atención en los aminoácidos que componen el β -giro, de nuevo se proyectan en la dirección del esqueleto peptídico, perpendiculares respecto a la orientación de los aminoácidos aromáticos.

4.4.5. Análogo [L-3'Pya11_L-Msa7_D-Trp8]-SST (11).

La segunda estructura de la familia de 3'Pya que presenta Msa7, [L-3'Pya11_L-Msa7_D-Trp8]-SST (11), que aunque se sigue disponiendo en una interacción π por un lado del péptido, con el anillo en 7 en la cara contraria, presenta sutiles diferencias respecto a los análogos 7, 9 y 10 (figura 4.10).³⁰ El par 6-11, de nuevo unidos bajo una interacción *edge-fo-face*, queda orientado en el espacio en dirección al par D-Trp8_Lys9, paralelamente a la trayectoria del esqueleto amídico, a diferencia de los otros péptidos de esta familia.

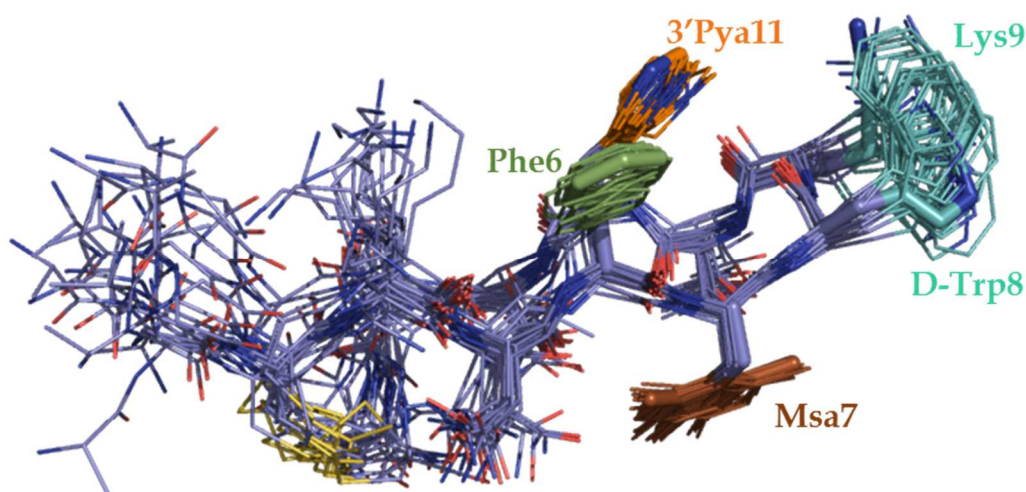


Figura 4.10. Superposición de las 25 estructuras de menor energía de [L-3'Pya11_L-Msa7_D-Trp8]-SST (11) según los datos experimentales de RMN.

A su vez, Msa7 se sitúa en dirección perpendicular a la del esqueleto peptídico, a diferencia de lo que ocurría en ejemplos anteriores (sin tener en

³⁰ Principales señales NOE que satisfacen esta estructura: a) **H α de Msa7** con H δ 21 y H δ 22 de Asn5. b) **H ϵ de Msa7** con H β 2, H β 3 de Asn5; H β y H γ de Thr10; H γ de Thr12. c) **H δ de Phe6** con H β 2, H δ 1 y H δ 2 de 3'Pya11. d) **H ϵ de Phe6** con H β 3 y H δ 2 de 3'Pya11.

Señales NOE que no satisfacen esta estructura: a) **H α de Msa7** con H δ 1 y H ζ 3 de D-Trp8. b) **H ϵ de Msa7** con H β 2 de Phe6.

cuenta el clúster de 8), debido a que los H ρ presentan una fuerte interacción con Asn5 y Thr12, y los H η de Msa7 dan señales NOE elevadas únicamente con los H γ de Thr10.

4.4.6. Discusión.

Como en los derivados fluorados, la inclusión de un anillo aromático de menor riqueza electrónica y conteniendo D-Trp8 ha permitido obtener estructuras de mayor rigidez espacial, mediante una potenciación de las interacciones aromáticas con otros anillos del péptido, pudiéndose determinar su ordenamiento preferente en disolución. Es interesante destacar que el anillo 3'-piridilo, aunque marcadamente menos hidrófobo que el de Phe o el de Dfp (lo que *a priori* debería dificultar la interacción aromática, al ser ésta regida por fuerzas hidrófobas, de van der Waals y electrónicas),³¹ mantiene los acercamientos aromáticos. Así, podemos concluir que la disminución del efecto hidrófobo se verá compensado con creces por el aumento de las fuerzas electrónicas entre los anillos aromáticos.

A pesar de que el anillo de 3'Pya es pobre en electrones como el de Dfp, como se ve en la figura 4.3, los efectos que tiene colocar este anillo piridilo en posiciones homólogas a las vistas en el capítulo III provoca cambios tanto estructurales como en el perfil de actividad de los péptidos resultantes. Estas variaciones en el tipo de interacción aromática pueden ser resultado de los factores electrónicos que intervienen en su formación: mientras que en la Dfp las proporciones electrónicas se resuelven de manera simétrica, generando dos núcleos de alta densidad en electrones fuera del anillo, en la 3'Pya esta densidad se reparte de manera asimétrica, concentrándose en torno al nitrógeno dentro del mismo aromático.

Esta diferencia de reparto electrónico explicaría que, en los péptidos estudiados 7-11, la 3'Pya favorece interacciones de tipo *edge-to-face*, en donde para todos los derivados es el anillo 11 el que orienta perpendicular a 6,

³¹ C. A. Hunter, K. R. Lawson, J. Perkins, C. J. Urch, *J. Chem. Soc. Perkin. Trans.*, **2001**, 5, 651-669.

independientemente de la posición que ocupe la 3'Pya. Esto no se reproduce en la familia de derivados Dfp donde priman las interacciones *offset-stacked* (análogos **1**, **3** y **4**) y *face-to-face* (derivados **2**, **5** y **6**), debido a que el anillo C_{AR}-F no favorece la orientación *edge-fo-face*. Incluso en los derivados **2** y **8**, ambos favoreciendo una interacción tipo clúster, se ve que el acercamiento correspondiente al aminoácido en séptima posición al otro par es mediado por una interacción *offset-stacked* en el caso del difluoro-análogo, y *edge-to-face* para el piridil-análogo (figura 4.6).

Llama la atención como de los cinco derivados estudiados en este capítulo, cuatro de ellos (**7**, **8**, **9** y **11**), presentan un perfil de unión elevado con el SSTR1. Ninguno de los análogos de Dfp estudiados en el capítulo III de esta tesis alcanza esos niveles de unión con dicho receptor. Pensamos que podría tratarse de un tipo de interacción de carácter hidrófobo y/o electrónico con un bolsillo de la proteína del receptor SSTR1: en los derivados estudiados en el presente tema, todos crean una región aromática en una de las caras del péptido. El área de anillos aromáticos sería de baja densidad electrónica, por la presencia de los anillos de piridilo. Sin embargo, para **7**, **8**, y **9**, la zona de mayor densidad electrónica en este sistema representada por el N_{AR} quedaría oculta en la cara posterior de los péptidos dentro de la misma interacción aromática acontecida, y en **11**, donde su nitrógeno quedaría protegido por el entorno aromático próximo. Dicha circunstancia no se produce en el caso del derivado **10**, cuyo nitrógeno queda más expuesto, orientándose hacia el perímetro de la molécula. Sería similar al caso de la familia de la Dfp, donde los dos flúores quedarían siempre revelado hacia la cara externa de la molécula, empeorando su afinidad hacia SSTR1. Aunque podría complementar la teoría del farmacóforo propuesto por Kaupmann³² para SSTR1, donde se plantea una interacción π entre la Phe7 de la SST14 con la Phe195 del receptor, con dicho postulado no se explicaría por qué **8** cuenta también con un elevado perfil de unión hacia SSTR1, teniendo en cuenta su estructura tridimensional de tipo clúster.

³² K. Kaupmann, C. Bruns, F. Raulf, H. P. Weber, H. Mattes, H. Lubbert, *EMBO J.*, **1995**, 14, 727-735.

Que el derivado **8** tenga un alto grado de unión con SSTR3, vista su estructura, es muy significativo: tanto en el derivado [L-Msa6_D-Trp8]-SST¹⁶ como en [L-Dfp7_D-Trp8]-SST (**2**), ambos formando sendos clústeres, la afinidad por este receptor es elevada. Más que el hecho de que sea por la presencia misma del clúster, postulamos que se trate por la orientación y cercanía espacial de tres anillos aromáticos, los cuales favorecerían una interacción con el SSTR3 posiblemente de carácter hidrófobo y/o electrónico.

Aunque los cinco derivados de 3'Pya igualan o superan la unión a SSTR2 marcada por el octreótido, el péptido **11** llega al mismo orden de afinidad que el definido por SST. En contra de lo que se pensó en un primer momento, la presencia de Msa7 *per se* no asegura un aumento en la afinidad por el SSTR2, ya que los factores electrónicos en la interacción de los anillos 6 y 11, y en última instancia su orientación, han de ser clave para asegurar la actividad sobre este receptor; así, se explicaría que, aun siendo elevada la Ki de **10**, no se alcancen tales niveles. Lo que sí parece confirmar es que, tal como ocurría con los derivados de difluorofenilalanina, la Msa7 disminuye considerablemente la afinidad con SSTR4 y SSTR5 de los péptidos que la contienen, lo que sí mejora su espectro de selectividad por los distintos SSTR.

Por último, cabe destacar que ninguno de los péptidos de esta familia presenta una elevada selectividad, dado que todos ellos presentan afinidad que oscila entre el mismo orden de magnitud que la SST o solamente uno superior por dos o más receptores. Esto impediría obtener una acción fisiológica concreta, debido a la inespecificidad de unión entre los cinco SSTR humanos descubiertos hasta la fecha, aunque podrían presentar utilidad en el caso de que su estabilidad destacase por encima de otros análogos.

4.5. Conclusiones.

Se ha observado que al incluir en la estructura tetradecapeptídica de somatostatina residuos de L-β-3'-piridilalanina se favorece la observación de

conformaciones preferidas en disolución acuosa. Se ha visto que los anillos piridilos aumentan la fuerza de las interacciones aromáticas y, a pesar de la disminución en la riqueza electrónica de sus anillos en comparación a los fenilos propios de la fenilalanina, favorecen una interacción de tipo *edge-to-face* en la cual es el anillo 11 quien acerca su lado a la cara del anillo en 6, independientemente de la posición que la 3'Pya ocupe. Difiere de lo observado con la Dfp, donde se favorecerían las interacciones de tipo *offset-stacked* o *face-to-face*.

Una vez más, un anillo pobre en electrones colocado sobre la posición 7 (análogo [L-3'Pya7_D-Trp8]-SST, **8**) favorece una interacción aromática tipo clúster, que tal como se ha visto en ejemplos anteriores, en el péptido [L-Dfp7_D-Trp8]-SST (**2**) o en [L-Msa6_D-Trp8]-SST, garantiza un perfil de unión adecuado sobre SSTR3 al nivel de la hormona nativa.

La inserción de un residuo de 3'Pya en las estructuras expuestas ha demostrado dirigir el mantenimiento de la afinidad por SSTR1. El origen de tal predisposición por ese receptor no está claro, aunque planteamos la posibilidad de que el empobrecimiento electrónico de los anillos, unido a una colocación concreta de la región rica en electrones representada en estos casos por el N_{AR}, sean el móvil detrás del cual estos péptidos mantengan elevado su valor de unión con el SSTR1.

Al mismo tiempo, observamos que la presencia del residuo L-mesitolalanina en posición 7, si bien no asegura un elevado grado de unión con el SSTR2, aumenta la selectividad hacia dicho receptor. Así, [L-3'Pya11_L-Msa7_D-Trp8]-SST (**11**) se une a SSTR2 en el orden de la somatostatina y [L-3'Pya6_L-Msa7_D-Trp8]-SST (**10**) disminuye su K_i al nivel del octreótido, pero ambos cuentan con un grado de unión pobre hacia SSTR4 y SSTR5, lo que mejora su perfil de selectividad para con SSTR2.

Capítulo V.

Análogos de somatostatina con L-4'Pyra-OH.

5.1 Introducción.

La L-3-(4'-piridil)alanina, L-β-4'-piridilalanina, L-4'Pya-OH o directamente acotada como 4'Pya, es un aminoácido no natural aromático de la familia de las piridilalaninas que, al igual que la 3'Pya (como se vio en el Capítulo IV), emula a los residuos endógenos fenilalanina, tirosina e histidina (figura 5.1).

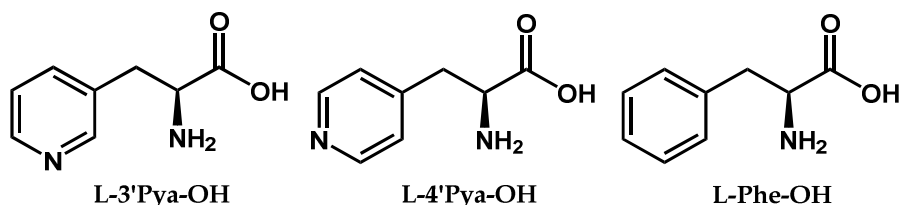


Figura 5.1. Estructura de la 4'Pya en comparación con 3'Pya y Phe.

Muchos de los trabajos bibliográficos en los que se trabaja con 3'Pya, la 4'Pya es usada paralelamente; de entre los que se mencionan en el Capítulo IV, recordar como muestra su uso como inhibidora de histidina descarboxilasa,¹ en fármacos antiinflamatorios² y antibacterianos,³ o como fragmento en análogos de LHRH,⁴ vasopresina,⁵ angiotensina II⁶ y ribonucleasas.⁷

Como era de esperar, las propiedades comunes que comparten los aminoácidos 3'Pya y 4'Pya son varias: el nitrógeno aromático provoca una disminución considerable en la densidad electrónica del anillo respecto a la fenilalanina, al mismo tiempo que hace al aminoácido mucho más hidrófilo: el logP del anillo de 4'Pya calculado es 1,18, el mismo que 3'Pya, mientras que el logP de la fenilalanina es 2,52. Sin embargo, el momento de la densidad

¹ a) G. W. Chang, E. E. Snell, *Biochemistry*, **1968**, 7, 2005-2012, b) S. Tanase, B. M. Guirard, E. E. Snell, *J. Biol. Chem.* **1985**, 260, 6738-6746.

² H. Shimeno, S. Soeda, A. Nagamatsu, *Chem. Pharm. Bull.*, **1977**, 25, 2983-2987.

³ a) Japan Patent JP 60/130591 A2, **1985**; b) European Patent EP 98609/A2, **1984**.

⁴ a) K. Folkers, C. Y. Bowers, T. M. Kubiak, J. Stepinski, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1983**, 111, 1089-1095; b) K. Folkers, C. Y. Bowers, T. M. Kubiak, J. Stepinski, U.S. Patent, **1985**, 4,504,414; c) J. E. Rivier, J. Porter, C. L. Rivier, M. Perrin, A. Corrigan, W. A. Hook, R. P. Siraganian, W. W. Vale, *J. Med. Chem.*, **1986**, 29, 1846-51.

⁵ M. Sobocinska, I. Derdowska, J. Schwartz, G. Kupryszewski, *Peptides*, **1995**, 16, 389-393.

⁶ K. Heieh, E. C. Jorgensen, *J. Med. Chem.*, **1979**, 22, 1199-1206.

⁷ a) O. D. Van Batenburg, I. Voskuyl-Holtcamp, C. Schattenkerk, K. Hoes, K. E. T. Kerling, E. Havinga, *Biochem. J.*, **1977**, 163, 385-387, b) C. Hoes, J. Flaap, W. Bloemhoff, K. E. T. Kerliig, *Recl. Trau.Chim. Pays-Bas*, **1980**, 99, 99.

electrónica de ambos anillos no es el mismo: frente a la asimetría de 3'Pya, en la otra piridilalanina el N_{AR} en posición 4 crea un reparto simétrico en el anillo aromático, haciendo equivalentes a ambos H_δ y ambos H_ε entre sí (figura 5.2).

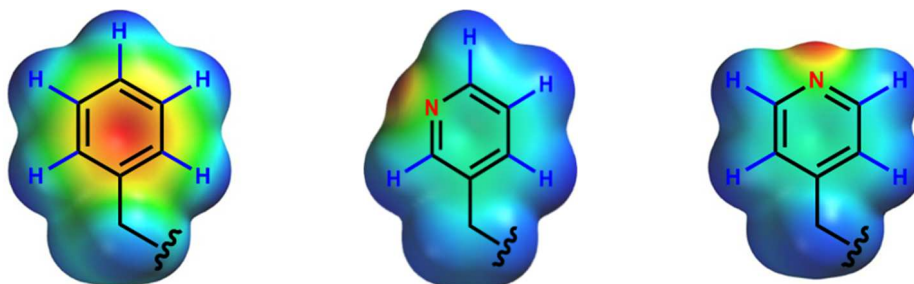


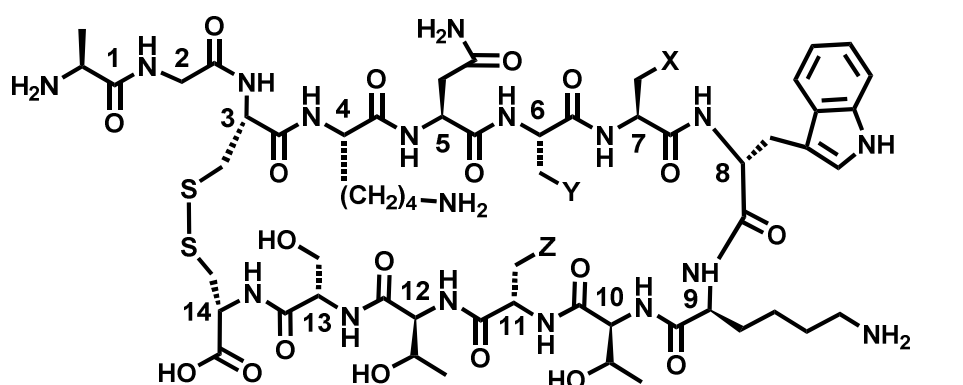
Figura 5.2. Densidades electrónicas comparadas entre el anillo fenilo de la Phe (izquierda), el 3'piridilo de la 3'Pya (centro) y el 4'piridilo de la 4'Pya (derecha). Azul = densidad electrónica baja. Rojo = densidad electrónica alta. Cálculo en Spartan (semi-empírico AM1).⁸

Al usarse la 3'Pya en diferentes posiciones de la estructura de somatostatina, quedó demostrado cómo su incorporación era capaz de crear una estructura tridimensional mayoritaria en disolución. A pesar de que la pobreza en electrones del anillo hizo suponer un comportamiento en las interacciones aromáticas similar al de la Dfp, la 3'Pya demostró favorecer geometrías de acercamiento diferentes a los del aminoácido difluorado. Hemos postulado que esta diferencia viene por el distinto comportamiento hidrófobo entre ambos anillos y por la distinta distribución electrónica en el anillo, la cual se relaciona con la presencia de los dos halógenos de la Dfp que crean sendos núcleos de densidad electrónica extra anulares, mientras que en el anillo nitrogenado esta densidad aparece recluida en el mismo ciclo. Por tanto, nos planteamos las posibilidades que podría tener un anillo con las mismas propiedades electrónicas e hidrófobas que la 3'Pya, pero distribuyendo la densidad de electrones de manera simétrica respecto a la cadena lateral del aminoácido. Así, comenzamos el estudio de derivados de somatostatina que incluyen L-β-4'-piridilalanina en su estructura, para llevar a cabo, nuevamente, sus análisis conformacional y de actividad biológica en sistemas que emulen las condiciones fisiológicas, y de esta manera seguir ahondando en las posibilidades de los análogos no naturales de SST14.

⁸ Spartan '10 v. 1.1.0 (Wavefunction).

5.2. Síntesis de análogos de somatostatina con L-β-4'-piridilalanina.

Al igual que con los análogos de L-3'Pya-OH, hemos preparado una familia de análogos donde se ha sustituido una de las fenilalaninas presentes en la secuencia por 4'Pya (tabla 5.1), manteniendo como sustitución fija el D-Trp8, dando lugar a los péptidos [L-4'Pya6_D-Trp8]-SST (**12**), [L-4'Pya7_D-Trp8]-SST (**13**) y [L-4'Pya11_D-Trp8]-SST (**14**). Además, se incluyó Msa7 para estudiar su papel,⁹ para dar los dos derivados correspondientes [L-4'Pya6_L-Msa7_D-Trp8]-SST (**15**) y [L-4'Pya11_L-Msa7_D-Trp8]-SST (**16**).



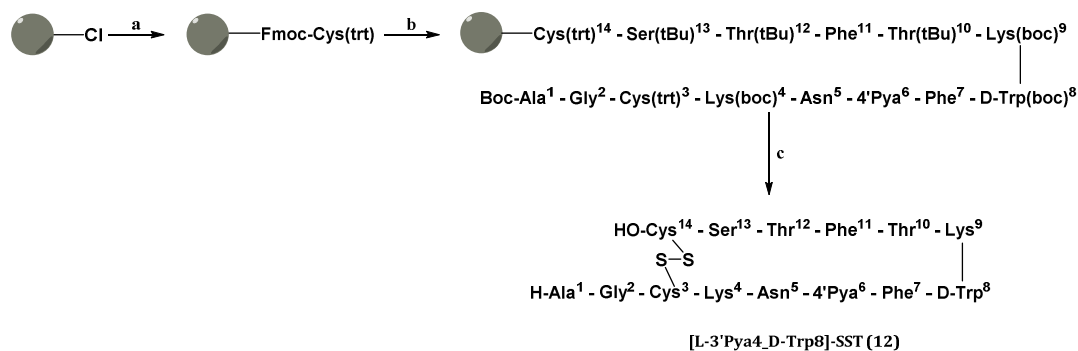
	6°	7°	8°	11°
[L-4'Pya6_D-Trp8]-SST (12)	4'Pya	Phe	D-Trp	Phe
[L-4'Pya7_D-Trp8]-SST (13)	Phe	4'Pya	D-Trp	Phe
[L-4'Pya11_D-Trp8]-SST (14)	Phe	Phe	D-Trp	4'Pya
[L-4'Pya6_L-Msa7_D-Trp8]-SST (15)	4'Pya	Msa	D-Trp	Phe
[L-4'Pya11_L-Msa7_D-Trp8]-SST (16)	Phe	Msa	D-Trp	4'Pya

Tabla 5.1. Derivados de somatostatina con 4'Pya presentados en este capítulo.

Los análogos peptídicos se realizaron siguiendo el protocolo de síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS) mediante la estrategia Fmoc/^tBu en resina 2-clorotritil cloruro (esquema 5.1).¹⁰ El aminoácido protegido Fmoc-L-Msa-OH se sintetizó siguiendo los procesos descritos anteriormente en nuestro grupo de investigación;⁹ se usó aminoácido Fmoc-L-4'Pya-OH comercial.

⁹ a) P. A. Martín-Gago, tesis doctoral *Synthesis of highly structured and receptor-selective tetradecapeptidic analogs of somatostatin: Fine-tuning the non-covalent interactions among their aromatic residues*, Universidad de Barcelona, 2013; b) P. Martín-Gago, M. Gómez-Caminals, R. Ramón, X. Verdaguer, P. Martín-Malpartida, E. Aragón, J. Fernández-Carneado, B. Ponsati, P. López-Ruiz, M. A. Cortés, B. Colás, M. J. Macías, A. Riera, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2012**, *51*, 1820-1825.

¹⁰ G. B. Fields, R. L. Noble, *Int. J. Protein Res.*, **1990**, *35*, 161-214.



Esquema 5.1. Ejemplo de síntesis, péptido **12**. a) 1. Fmoc-L-Cys(trt)-OH (3 eq), DIEA (3 eq), 2. MeOH; b) 1. Piperidina 20% DMF, 2. Fmoc-Aaa-OH (1.5–3 eq), DIPCDI (3 eq), HOBT (3 eq), DMF (x12), 3. Piperidina 20% DMF, 4. Boc-Ala-OH, DIPCDI (3 eq), HOBT (3 eq), DMF; c) 1. CH₂Cl₂/TFE/AcOH, 2. I₂, 3. TFA/CH₂Cl₂/anisol/H₂O.

Tal como describió Hirschmann para la síntesis de [L-Pyz11_D-Trp8]-SST,¹¹ además de lo visto para el análogo [L-3'Pya11_D-Trp8]-SST (**9**), durante la síntesis del péptido **14** el acoplamiento del aminoácido Fmoc-L-Asn-OH en posición 5 fue complicado, por lo cual se necesitó reacoplar este residuo. Pensamos que se debe a la presencia de algún impedimento estérico inducido por los nitrógenos aromáticos en los anillos en posición 11: si favoreciese un plegamiento de la cadena unida a la resina mediante interacciones aromáticas con el residuo aromático en sexta posición, podría dificultar el acoplamiento del siguiente aminoácido, que correspondería a la Asn5.

5.3. Ensayos biológicos.

Para todos los derivados sintetizados se determinaron los perfiles de actividad biológica frente a SSTR1-5, en estudios basados en el trabajo de Rens-Domiano *et al.*¹² Las determinaciones de afinidad fueron llevadas a cabo externamente por la compañía Eurofins Scientific.¹³ Los resultados se muestran en la tabla 5.2, expresando los resultados como Ki.

¹¹ S. Neelamkavil, B. Arison, E. Birzin, J. Feng, K. Chen, A. Lin, F. Cheng, L. Taylor, E. R. Thornton, A. B. Smith III, R. Hirschmann, *J. Med. Chem.*, **2005**, *48*, 4025-4030.

¹² S. Rens-Domiano, S. F. Law, Y. Yamada, S. Seino, G. I. Bell, T. Reisine, *Mol. Pharmacol.*, **1992**, *42*, 28-34.

¹³ Eurofins Panlabs Inc., de Eurofins Scientific.

	SSTR1 (nM)	SSTR2 (nM)	SSTR3 (nM)	SSTR4 (nM)	SSTR5 (nM)
SST14	1,88	0,016	0,25	1,55	0,76
Octreótido	480	0,77	13,0	>1000	21,0
[L-4'Pya6_D-Trp8]-SST (12)	22,0	0,370	10,2	54,0	2,99
[L-4'Pya7_D-Trp8]-SST (13)	42,0	0,051	3,83	43,0	13,4
[L-4'Pya11_D-Trp8]-SST (14)	7,08	0,062	0,42	10,3	2,72
[L-4'Pya6_L-Msa7_D-Trp8]-SST (15)	52,0	0,078	>100	>1000	>100
[L-4'Pya11_L-Msa7_D-Trp8]-SST (16)	8,29	0,030	5,68	92,0	36,0

Tabla 5.2. Datos de afinidad frente a los SSTR1-5.

Destaca en los valores obtenidos la afinidad que estos péptidos muestran por SSTR2, alcanzando el mismo orden de magnitud que el marcado por la somatostatina en **13-16**. Los análogos **14** y **16** muestran un buen perfil de unión con SSTR1, además **14**, que sería el péptido más polivalente de los estudiados en este capítulo, también alcanza una buena afinidad con SSTR3. Esta familia de derivados de somatostatina acusa una pérdida de afinidad con SSTR4, potenciada en los análogos **15** y **16**, ambos con Msa7 y, también, baja afinidad por SSTR5. Analizando los valores de Ki por SSTR1-5 del péptido **15**, posiblemente se trate del análogo más interesante estudiado en nuestro grupo de investigación hasta ahora, al tener un perfil de selectividad y afinidad por SSTR2 tan elevado. Al finalizar el análisis de las estructuras de cada uno de los péptidos, se volverá sobre estos resultados, para establecer un patrón que relacione este comportamiento biológico con la disposición tridimensional en disolución.

5.4. Estructura.

Todos los derivados de esta familia fueron caracterizados mediante técnicas espectroscópicas de RMN, mediante la obtención de sus respectivos espectros homonucleares monodimensionales y bidimensionales ¹H-¹H TOCSY y NOESY.¹⁴ El procedimiento seguido fue el descrito en el punto 3.4 de la presente tesis doctoral. En todos ellos se obtuvo un volumen de información

¹⁴ K. Wuethrich, G. Wider, G. Wagner, W. Braun, *J. Mol. Biol.*, **1982**, *155*, 311-319.

suficiente como para ser incluidos en el programa de cálculo CNS¹⁵ mediante la interfaz StrutCalc,¹⁶ lanzando un número variable de cálculos desde donde se determinaron las estructuras mayoritarias en disolución con alto grado de convergencia y con la mínima energía, respetando en estas conformaciones los ángulos diedros permitidos según los diagramas de Ramachandran.¹⁷

De nuevo los péptidos que incluyen en su secuencia L-Msa7 presentan una mayor cantidad de información que favorece la determinación de la estructura mayoritaria en disolución de estos péptidos, debido a la mayor cantidad de hidrógenos en su estructura correspondientes a las posiciones metílicas y a sus H ϵ aromáticos apantallados, así como favorecer una restricción conformacional mayor en los derivados que lo presentan.

El acercamiento entre los residuos D-Trp8 y L-Lys9 fue el esperado, mediante la interacción alifática-aromática entre ambos residuos. El alto grado de apantallamiento de los H γ de la L-Lys9, detectado en los espectros bidimensionales de todos estos péptidos, adelantaba lo que más tarde se confirmó al definir las estructuras mediante el programa de cálculo.

Tal como ocurría en la 3'Pyra, los H ϵ aromáticos vecinales al N_{AR} de la 4'Pyra se encuentran muy desapantallados en comparación a los H_{AR} de la Phe. Al tener mayor desplazamiento químico en los espectros, y por tanto al alejarse del cuadrante clásico de protones aromáticos, permite establecer con mayor facilidad los correspondientes NOEs de interacción H_{AR}-H_{AR}. Sin embargo, a diferencia de la 3'Pyra, en este aminoácido no natural sólo cuenta con dos señales aromáticas diferentes (figura 5.3), frente a las cuatro del isómero con el nitrógeno en posición 3', con lo que supone una disminución de la información en esta familia respecto a la estudiada en el Capítulo IV.

¹⁵ A. T. Brunger, P. D. Adams, G. M. Clore, W. L. DeLano, P. Gros, R. W. Grosse-Kunstleve, J. S. Jiang, J. Kuszewski, M. Nilges, N. S. Pannu, R. J. Read, L. M. Rice, T. Simonson, G. L. Warren *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **1998**, *54*, 905-921.

¹⁶ P. Martín-Malpartida, M. J. Macías, datos sin publicar.

¹⁷ G. N. Ramachandran, C. Ramakrishnan, V. Sasisekharan, *J. Mol. Biol.*, **1963**, *7*, 95-99.

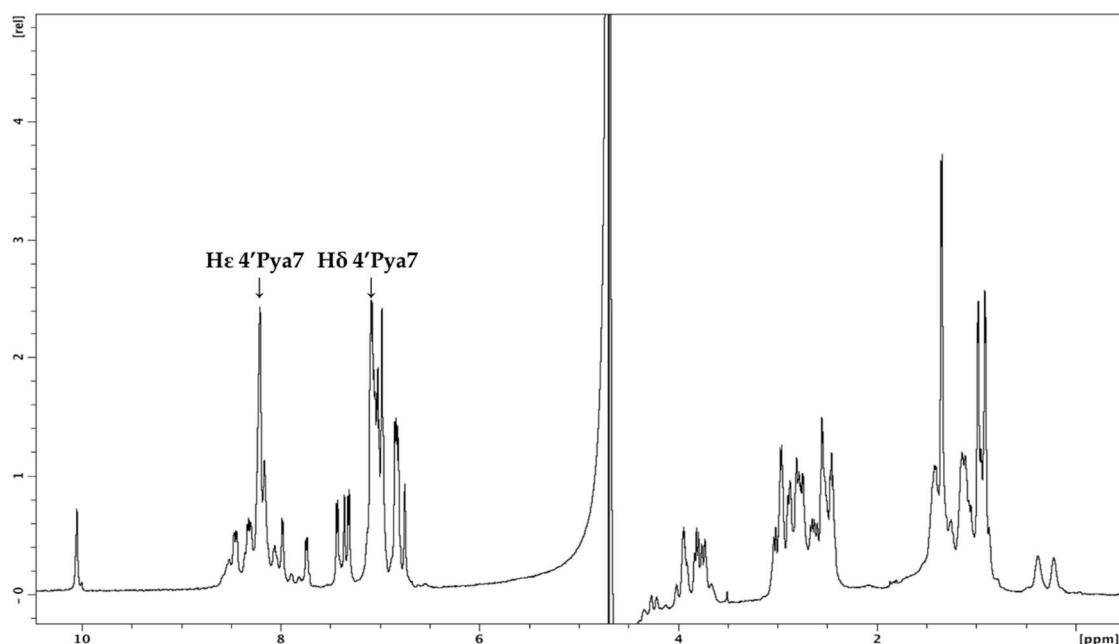


Figura 5.3. Espectro monodimensional del péptido [L-4'Pya7_D-Trp8]-SST (**13**), resaltando las posiciones de los protones aromáticos del aminoácido L-4'Pya.

5.4.1. Análogo [L-4'Pya6_D-Trp8]-SST (**12**).

El péptido [L-4'Pya6_D-Trp8]-SST (**12**), presenta un elevado grado de convergencia en sus estructuras de menor energía, y de rigidez tanto en su esqueleto peptídico como en las cadenas laterales, tal como se muestra en la figura 5.4.¹⁸ Presenta un ordenamiento en donde se produce una interacción aromática entre los residuos 6 y 11, y 7 queda colocado al otro lado de la estructura, orientado siguiendo la dirección del esqueleto en dirección al puente disulfuro. La aproximación aromática que presentan los aminoácidos 4'Pya6 y Phe11 es de tipo *edge-to-face*, donde uno de los H δ y su vecino H ϵ de 4'Pya se aproximan a la nube π del anillo de Phe11. D-Trp8_Lys9 presenta una ordenación espacial doble, a causa de la ausencia de señales NOE, pero se observa una población de cadenas laterales mayoritaria orientada hacia el lado del péptido donde interacciona el par 6-11.

¹⁸ Principales señales NOE que satisfacen esta estructura: a) **H δ de Phe7** con H β 2 y H δ 22 de Asn5; H γ de Thr12. b) **H ϵ de Phe7** con H β 2 de Asn5; H γ de Thr12. c) **H ϵ de 4'Pya6** con H β 2, H δ y H ϵ de Phe11. d) **H δ de Phe11** con H α , H β 2 y H β 3 de 4'Pya6.

Señales NOE que no satisfacen esta estructura, detectadas en el espectro bidimensional: **H β 2 de Asn5** con H δ de 4'Pya6; H δ y H ϵ de Phe11. b) **H δ de 4'Pya6** con H γ de Thr12.

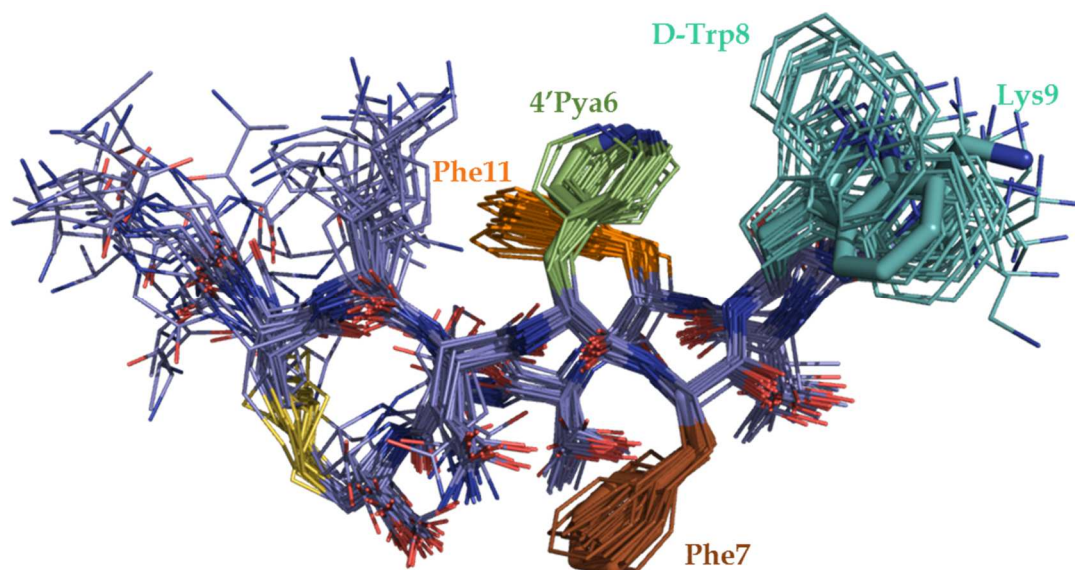


Figura 5.4. Superposición de las 25 estructuras de menor energía de [L-4'Pya6_D-Trp8]-SST (12) según los datos experimentales de RMN.

5.4.2. Análogo [L-4'Pya7_D-Trp8]-SST (13).

El segundo péptido de la 4'Pya, [L-4'Pya7_D-Trp8]-SST (13), presenta un comportamiento dual en el cual hay dos disposiciones tridimensionales mayoritarias, tal como se aprecia en la figura 5.5 y 5.6. Este tipo de circunstancia suele ser difícil de detectar, ya que si la variabilidad conformacional es alta, las señales NOE correspondientes a cada conformación son demasiado débiles. Debido a ello, el grado de convergencia para cada estructura ha sido menor al habitual. Es el resultado de la dificultad que entrañaba para el programa de cálculo obtener estructuras convergentes similares, incluso imponiendo diferentes restricciones en los ángulos diedros de los aminoácidos.

En la primera de las estructuras definidas (figura 5.5), de interacción tipo 6-11, ambos residuos de fenilalanina muestran un acercamiento de tipo *edge-to-face*, en donde principalmente H δ , pero también H ϵ , de Phe6 se acercan a la cara de elevada densidad electrónica de Phe11. Así, 4'Pya7 quedaría dispuesto en el lado contrario de la cadena, orientado perpendicularmente al esqueleto peptídico y apuntando parcialmente hacia el puente disulfuro; esto explicaría que en su espectro NOESY 350 ms, se detecten interacciones entre los H_{AR} de 4'Pya7 con Asn5 y Thr12. A causa de la ausencia de señales NOE con el resto de la molécula,

el dueto D-Trp8_Lys9 presenta una variabilidad conformacional en donde es difícil discernir una orientación predominante.

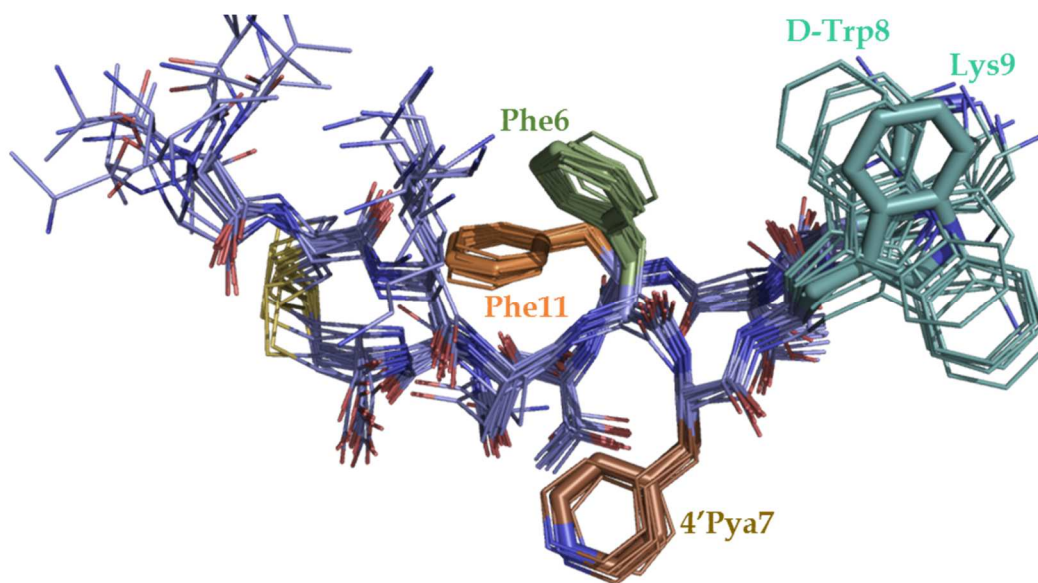


Figura 5.5. Superposición de las 15 estructuras de menor energía de [L-4'Pya7_D-Trp8]-SST (13) según los datos experimentales de RMN para una estructura de tipo residuos 6 y 11 enfrentados.

La segunda estructura determinada (figura 5.6) presenta una arquitectura de tipo clúster, que difiere sustancialmente de las obtenidas para los derivados [L-Dfp7_D-Trp8]-SST (2) y [L-3'Pya7_D-Trp8]-SST (8).

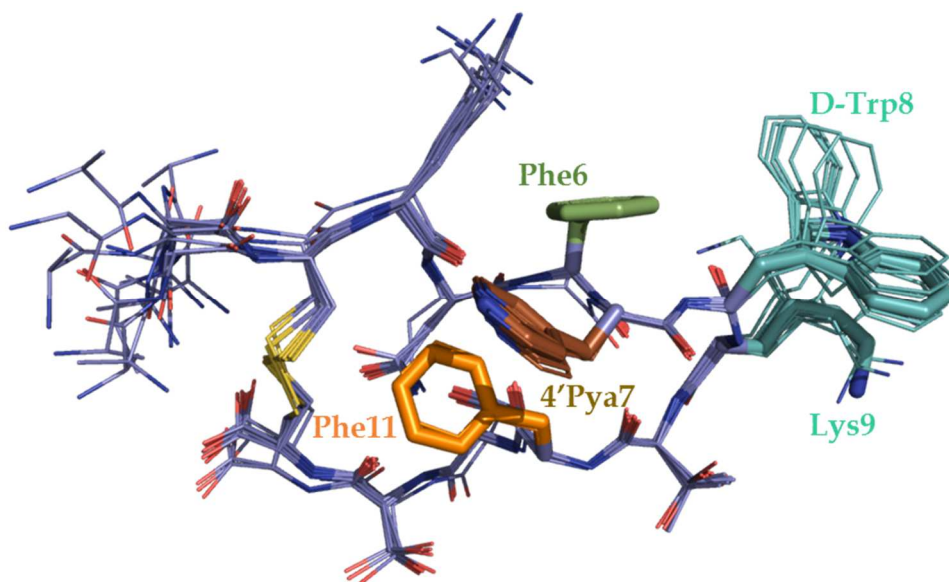


Figura 5.6. Superposición de las 12 estructuras de menor energía de [L-4'Pya7_D-Trp8]-SST (13) según los datos experimentales de RMN para una estructura de tipo clúster.

Tanto en 2 como en 8, el aminoácido no natural se acercaba a la fuerte interacción que tenían las dos fenilalaninas entre sí. En este caso, la 4'Pya se

interpone entre los residuos 6 y 11 para formar, con ambos, dos interacciones de tipo π - π *offset-stacked*, como se aprecia en la figura 5.7. De esta forma, se explicarían las interacciones NOE de los H ϵ de 4'Pya7 con los otros dos anillos aromáticos, detectadas en el espectro. D-Trp8_Lys9 presentan al menos dos orientaciones en este caso.

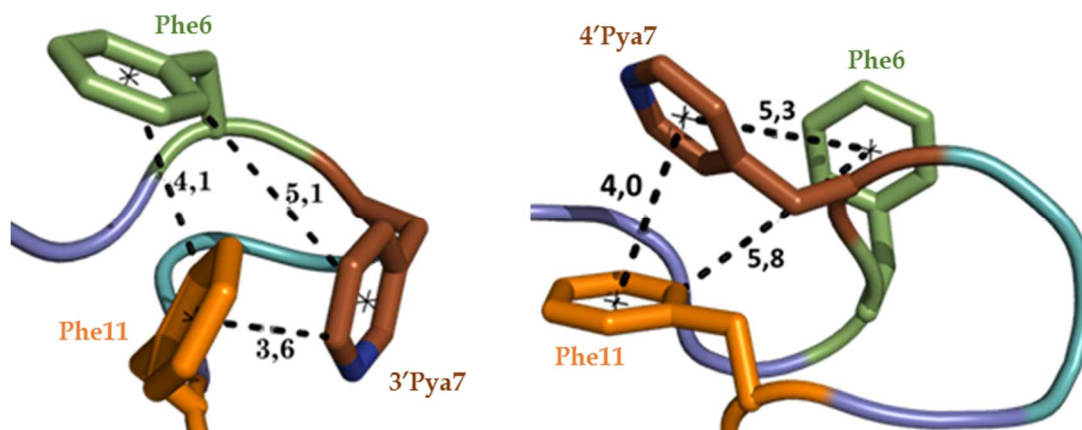


Figura 5.7. Comparación de los núcleos aromáticos de los derivados [L-3'Pya7_D-Trp8]-SST 8 (izquierda) y [L-4'Pya7_D-Trp8]-SST 13 (derecha). Distancias expresadas en Ångström (Å).

En la figura 5.8 se detallan esquemáticamente las interacciones detectadas por RMN.

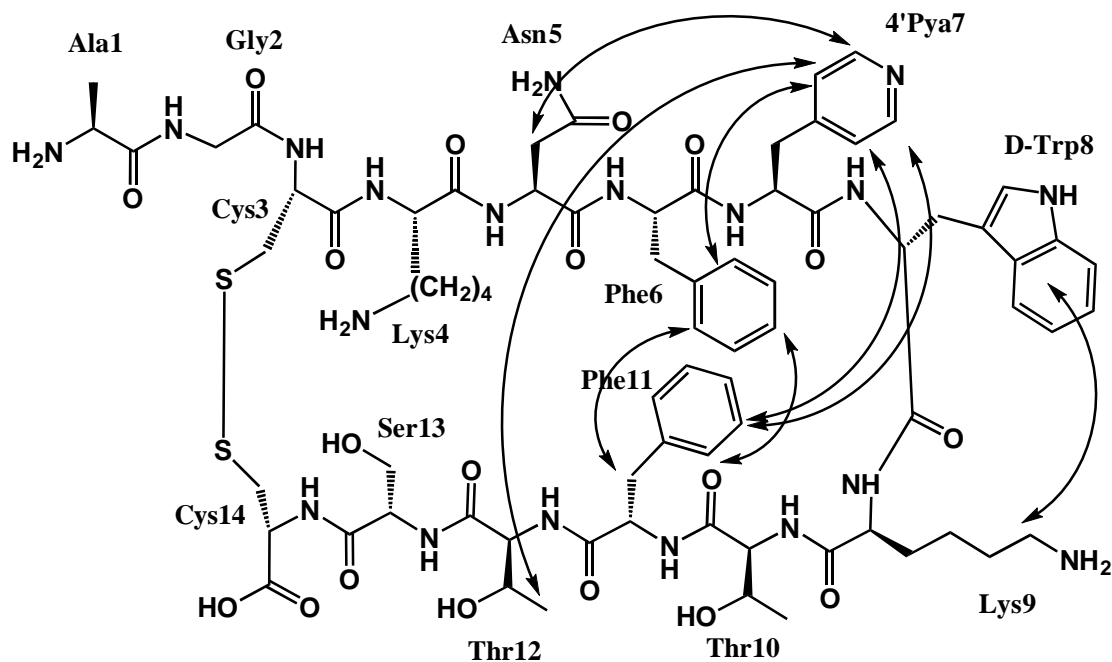


Figura 5.8. Representación esquemática de las interacciones NOE detectadas de 4'Pya7 en los espectros del péptido [L-4'Pya7_D-Trp8]-SST 13.

5.4.3. Análogo [L-4'Pya11_D-Trp8]-SST (14).

El tercer péptido estudiado en este capítulo, [L-4'Pya11_D-Trp8]-SST (14), presenta una particularidad que llama la atención de su estructura, plasmada en la figura 5.9,¹⁹ que es la cercanía del par D-Trp8_Lys9 a la pareja Phe6-4'Pya11.

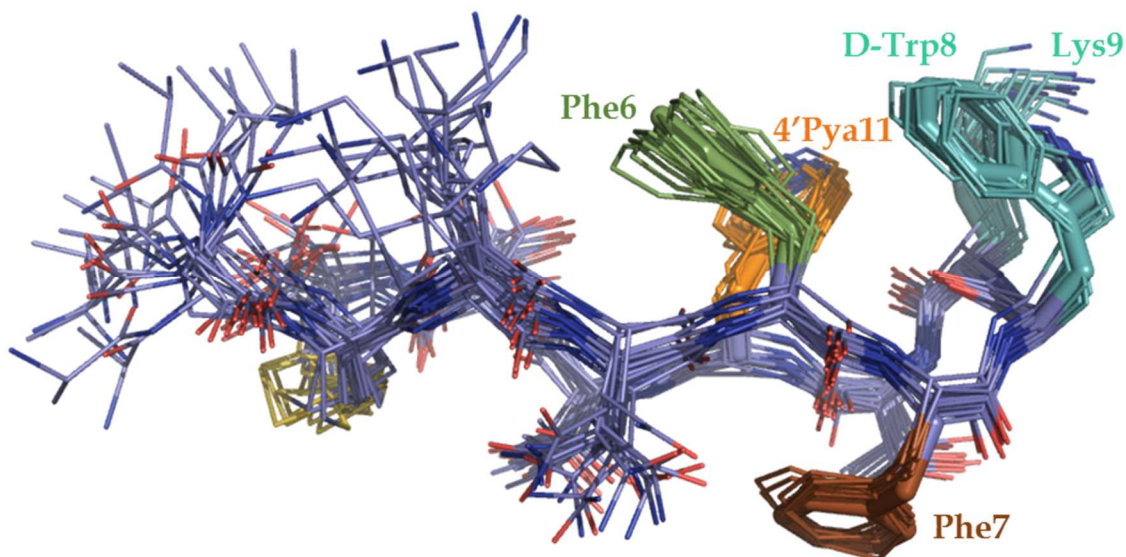


Figura 5.9. Superposición de las 25 estructuras de menor energía de [L-4'Pya11_D-Trp8]-SST (14) según los datos experimentales de RMN.

De nuevo se produce una interacción entre los residuos distales de tipo *edge-to-face*, donde la periferia pobre en electros de Phe6 se acerca al N_{AR} de 4'Pya11. Además, la nube π de Phe6 atrae hacia ella los protones más distales del D-Trp8, acercando ambos aminoácidos espacialmente, tal como se detecta, según las pruebas espectroscópicas, por las interacciones entre Phe6/4'Pya11 con D-Trp8/Lys9. Debido a este acercamiento, las variaciones en la disposición tridimensional de D-Trp8_Lys9 quedan acotadas en comparación con otros análogos estudiados. Por la misma razón, el giro en el esqueleto peptídico provoca que la orientación más favorable de la Phe7 sea de manera perpendicular a la dirección del esqueleto del péptido, en sintonía con sus interacciones NOE del espectro de RMN.

¹⁹ Principales señales NOE que satisfacen esta estructura: a) **H δ de Phe7** con H γ de Thr10; H β y H γ de Thr12. b) **H ϵ de Phe7** con H γ de Thr10; H α y H γ de Thr12. c) **H δ de 4'Pya11** con H β 2 y H β 3 de Phe6; H α , H ϵ 2 y H ϵ 3 de Lys9. d) **H ϵ de 4'Pya11** con H δ y H ϵ de Phe6.

Señales NOE que no satisfacen esta estructura: **H γ de Thr12** con H δ de Phe6; H δ de 4'Pya11.

5.4.4. Análogo [L-4'Pya6_L-Msa7_D-Trp8]-SST (15).

El cuarto análogo, [L-4'Pya6_L-Msa7_D-Trp8]-SST (15), es el primero que contiene Msa7 que, tal como se ve en su estructura en la figura 5.10,²⁰ se orienta por una de las caras del péptido en dirección al puente disulfuro, mostrando un cierto ángulo de inclinación respecto a la dirección del esqueleto peptídico. De mayor rigidez conformacional que los análogos previamente estudiados, el par 4'Pya6-Phe11 se orienta hacia el dúo D-Trp8_Lys9, mediando una interacción de tipo *edge-to-face*. A pesar de orientar sus cadenas laterales en dirección al β -giro, no se detectaron señales NOE entre estos anillos y el sistema D-Trp8_Lys9, lo que se traduce en la variabilidad espacial que muestran estos dos residuos, marcada por dos posibles orientaciones en la cual parece preferida la que aleja el anillo aromático de D-Trp8 de la pareja 6-11. Aunque sí presenta interacciones NOE entre el residuo de D-Trp8 con Msa7, no se refleja una cercanía espacial en esta estructura mayoritaria de baja energía. Guardaría cierta semejanza estructural con el análogo 12, sin Msa7 en su estructura.

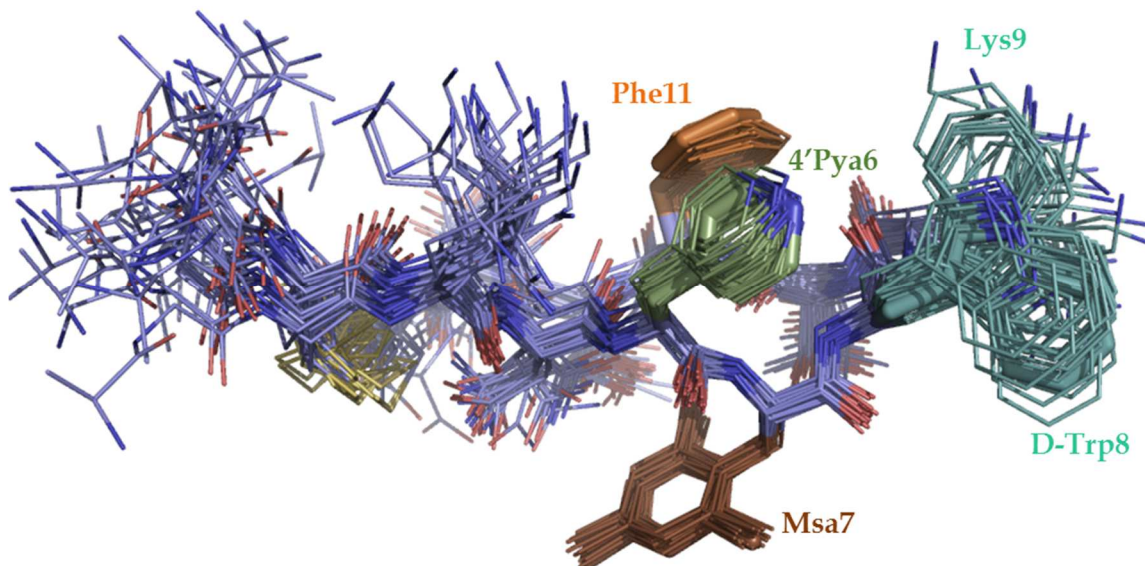


Figura 5.10. Superposición de las 25 estructuras de menor energía de [L-4'Pya6_L-Msa7_D-Trp8]-SST (15) según los datos experimentales de RMN.

²⁰ Principales señales NOE que satisfacen esta estructura: a) **H ϕ de Msa7** con H γ de Thr10; H γ de Thr12. b) **H η de Msa7** con H δ 21 y H δ 22 de Asn5. c) **H ϵ de Msa7** con H β 2, H β 3 y H δ 21 de Asn5; H α , H β y H γ de Thr12. d) **H ϵ de 4'Pya6** con H β 2, H δ y H ζ de Phe11. e) **H ϵ de Phe11** con H β 2, H β 3 y H ζ de 4'Pya6. Señales NOE que no satisfacen esta estructura: a) **H ϕ de Msa7** con H δ 1 y H ϵ 3 de D-Trp8; H δ de Phe11.

5.4.5. Análogo [L-4'Pya11_L-Msa7_D-Trp8]-SST (16).

El quinto y último análogo en este capítulo, [L-4'Pya11_L-Msa7_D-Trp8]-SST (16), también cuenta con una mesitilalanina en posición 7, pero su estructura (figura 5.11)²¹ difiere de la vista en 15.

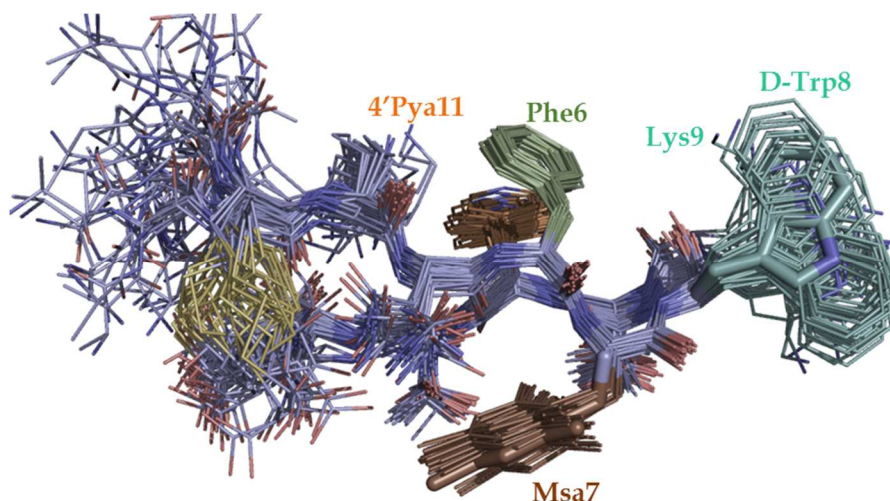


Figura 5.11. Superposición de las 25 estructuras de menor energía de [L-4'Pya11_L-Msa7_D-Trp8]-SST (16) según los datos experimentales de RMN.

En este análogo también se eleva considerablemente el grado de rigidez del esqueleto peptídico, más marcadamente en la zona correspondiente al farmacóforo clásico (desde el residuo 6 al 11). De nuevo Msa7 se direcciona hacia el puente disulfuro, aunque en esta ocasión la orientación anular es paralela al avance del esqueleto peptídico; en esta ocasión, no se detectaron señales NOE entre los protones metílicos de Msa7 con Thr10. Así mismo, el dúo D-Trp8_Lys9 se asemeja al dibujado en 15, en cuanto a variabilidad espacial y orientación relativa al esqueleto peptídico se refiere. Sin embargo, la diferencia más notable se asienta en la interacción del par Phe6-4'Pya11, que sería la situación contraria a la vista en 15, siendo aquí que la Phe6 se posiciona (relativamente) sobre 4'Pya11 *face-to-face*. En este sentido, sería más semejante a lo observado del derivado 14, aunque en aquel el D-Trp8 se acercaba a la pareja aromática.

²¹ Principales señales NOE que satisfacen esta estructura: a) **H ϕ de Msa7** con H δ 21 y H δ 22 de Asn5; HN de 4'Pya11. b) **H η de Msa7** con H δ 21 y H δ 22 de Asn5. c) **H ϵ de Msa7** con H β 2, H β 3 y H δ 21 de Asn5; H γ de Thr10; H β y H γ de Thr12. d) **H ϵ de 4'Pya11** con H β 2, H β 3, H δ y H ϵ de Phe6.

Señales NOE que no satisfacen esta estructura: a) **H ϕ de Msa7** con H δ de Phe6; H δ 1 de D-Trp8; H δ de 4'Pya11.

5.4.6. Discusión.

De nuevo, se demuestra que la capacidad de restricción conformacional no es patrimonio exclusivo de los anillos ricos en electrones. Así, todos los péptidos estudiados que incluyen en su estructura el aminoácido no natural 4'Pya presentan una estructura determinable, rígida y mayoritaria en disolución. Al igual que ocurría con la familia de péptidos de la 3'Pya, el efecto negativo que podría tener la disminución de la hidrofobia sobre las interacciones aromáticas,²² queda compensado por el aumento de las interacciones electrónicas, las cuales son propiciadas por el desigual reparto de la densidad electrónica en el anillo.

Con la familia de la 3'Pya, la sustitución de un residuo concreto no producía un ordenamiento ni un perfil de actividad biológico similares a su respectivo homólogo con Dfp. De nuevo, más allá de las semejanzas en el tipo de ordenamiento general (estructura tipo clúster versus estructura 6-11 enfrentados), en la familia de las 4'Pya tampoco se obtienen equivalentes tridimensionales a los vistos en los capítulos III y IV. Esperábamos que un cambio menor, como es la modificación de la posición del N_{AR}, no tuviera grandes consecuencias sobre las estructuras. Al contrario, se ha observado que efectivamente modifica la disposición tridimensional de estos péptidos y que, en consecuencia, el perfil de afinidad por los SSTR también se ve alterado.

En los péptidos **12**, **13** (en una de sus conformaciones), **14** y **15**, las interacciones entre los residuos en posiciones 6 y 11 se ven definidas por un acercamiento *edge-to-face*, en donde la periferia pobre en electrones del sexto anillo se acerca a la cara π del residuo en undécima posición. Tal como vimos en el capítulo IV, en la familia de las 3'Pya este tipo de interacciones también se ven favorecidas, cambiando el orden de los factores: en **7**, **9**, **10** y **11** el borde aromático de 11 se aproxima a la cara π de 6. Se cumple, tanto en un caso como en otro, independientemente de la posición que ocupe la piridilalanina. El único péptido que se salta esta norma es **16**, cuyo acercamiento 6-11 se resuelve *face-to-face*.

²² C. A. Hunter, K. R. Lawson, J. Perkins, C. J. Urch, *J. Chem. Soc. Perkin. Trans.*, **2001**, 5, 651-669.

El análogo **13** presenta un comportamiento dual, muy difícil de detectar mediante técnicas espectroscópicas, ya que al oscilar en disolución entre dos o más ordenamientos suele debilitar el cómputo global de las señales NOE. Cuenta con una arquitectura de aproximación *edge-to-face* (figura 5.5), comentada en el párrafo anterior, que sigue las pautas de ordenamiento de esta familia de péptidos, pero también presenta un ordenamiento de tipo clúster (figura 5.6), tal como acontece en los péptidos homólogos [L-Dfp7_D-Trp8]-SST (**2**) y [L-3'Pyra7_D-Trp8]-SST (**8**). Esto significa que si bien no se trata de un ordenamiento único para **13**, sigue siendo favorecida la formación de un clúster aromático al incluir un aminoácido pobre en electrones en posición siete de la secuencia. Esta coyuntura explicaría la relativamente baja afinidad por SSTR3 (comparándolo con **2** y **8**), y que consiga unos valores de afinidad altos con SSTR2.

La versatilidad del análogo **14** llama la atención, así como su estructura tampoco deja indiferente: con un nivel de selectividad bajo, este péptido alcanza valores muy cercanos a la somatostatina en SSTR1, SSTR2 y SSTR3. Se trata de un derivado donde D-Trp8 se acerca a Phe6, para dar una disposición tridimensional similar a la de un clúster (figura 5.9). Como se comentó en el Capítulo IV, es bastante probable que en la unión con SSTR3 intervenga una interacción de tipo hidrófoba y que, a consecuencia de ello, la creación de una zona de alta densidad aromática favorezca la afinidad para este receptor. Así mismo, **14** y **16** comparten un elevado perfil de unión por SSTR1. En ambos, el nitrógeno en el anillo aromático queda orientado hacia la cara posterior del péptido, tal como ocurre en los péptidos de la familia de la 3'Pyra que son afines a este receptor. Es más, **12**, **13** y **15**, que exponen su N_{AR} por la cara anterior, tienen aquí disminuida su afinidad. Coincidiría con lo postulado en el Capítulo IV, en donde para presentar un nivel de unión adecuado con SSTR1 haría falta una zona de interacción aromática en donde el mayor nivel de densidad electrónica (que sería el entorno del N_{AR}) no quedase expuesto por la cara anterior del péptido.

Tal como ocurría con los péptidos **7-11**, estos análogos establecen un nivel de unión con SSTR2 alto, tanto es así que **13-16** alcanzan los valores nominales

de orden de magnitud de la somatostatina. La homogeneidad de resultados de afinidad por este receptor hace pensar que no se puede establecer un perfil de relación estructura-actividad simple, en el que intervendrían de manera aislada regiones únicas de la estructura. Así mismo, no ha de estar mediado tampoco por un aumento de rigidez, tal como postuló Reisene,²³ ya que la mayoría de péptidos estudiados en la presente tesis doctoral alcanzan un elevado grado de rigidez estructural en disolución acuosa sin llegar a los valores de afinidad de somatostatina por SSTR2.

Sin embargo, de los cinco péptidos sintetizados con 4'Pya, **15** alcanza una estructura y perfil de actividad únicos, mostrando una elevada selectividad por SSTR2. Una vez más se confirma que, si bien Msa7 no ayuda necesariamente a establecer una afinidad alta por SSTR2, al disminuir la unión con SSTR4 y SSTR5 mejoran notablemente su selectividad; dicho fenómeno se reproduce tanto en **15** como en **16**. Pero además, la enorme pérdida de actividad que sufre **15** en SSTR4 y SSTR5, así como en SSTR3 y en menor medida SSTR1 (gracias, posiblemente, a la orientación del par 6-11), hacen de él un péptido único al ser un derivado tetradecapeptídico con estructura rígida completamente selectivo a un único receptor. Esta rareza conviene ser estudiada con mayor detalle, porque podría abrir las puertas a la determinación exacta del tipo de estructura y/o interacciones necesarias para garantizar la unión a SSTR2, de manera más precisa de lo que anteriormente postulamos en nuestro grupo de investigación con [L-Msa7_D-Trp8]-SST (figura 5.12).^{10b}

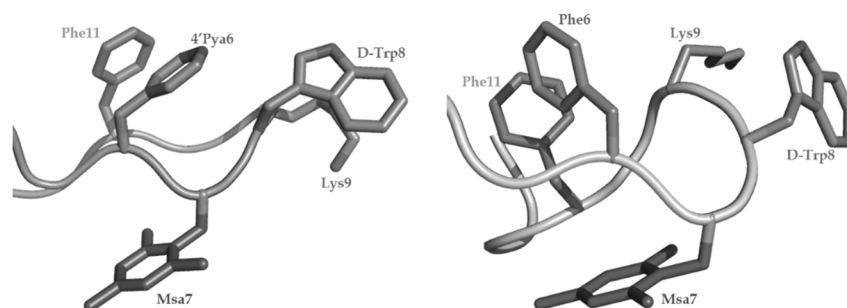


Figura 5.12. Comparación de estructuras entre el derivado [L-4'Pya6_L-Msa7_D-Trp8]-SST (**15**) (izquierda) y el péptido [L-Msa7_D-Trp8]-SST (derecha).

²³ T. Reisene, *Cell. Mol. Neurobiol.*, **1995**, *15*, 597-614.

5.5. Conclusiones.

La inclusión del aminoácido no natural L- β -4'-piridilalanina, de propiedades fisicoquímicas similares a L- β -3'-piridilalanina, ha demostrado ser capaz de restringir conformacionalmente la estructura de derivados tetradecapeptídicos de somatostatina. Además, los anillos 4'-piridilos favorecen, en la mayoría de los casos, interacciones aromáticas de tipo *edge-to-face* acercando la periferia del anillo del sexto residuo a la cara π electrónica del anillo en posición once, independientemente de la posición que ocupe en la secuencia la 4'Pya.

El análogo [L-4'Pya7_D-Trp8]-SST (**13**) presenta un comportamiento dual en disolución en el cual se determinaron dos arquitecturas, una de tipo clúster esperable tras lo aprendido de [L-Dfp7_D-Trp8]-SST (**2**) y [L-3'Pya7_D-Trp8]-SST (**8**), y otra de tipo interacción 6-11 por una cara de la molécula y el residuo 7 dispuesto en la cara contraria. A causa de esto, el perfil de actividad biológica varía respecto al obtenido en **2** y **8**.

Los análogos [L-4'Pya7_D-Trp8]-SST (**13**), [L-4'Pya11_D-Trp8]-SST (**14**), [L-4'Pya6_L-Msa7_D-Trp8]-SST (**15**) y [L-4'Pya11_L-Msa7_D-Trp8]-SST (**16**) presentan elevada afinidad por SSTR2. Esta aparente homogeneidad de valores dificulta establecer un patrón de relación estructura-actividad para este receptor.

Una vez más, la inclusión de L-mesitilalanina en posición siete favorece el perfil de selectividad, al disminuir considerablemente la unión con SSTR4 y SSTR5, como demuestran **15** y **16**. Además, **15** disminuye considerablemente su unión con SSTR1 y SSTR3, lo que le hace el único tetradecapéptido derivado de somatostatina estudiado por nuestro grupo con una selectividad tan alta hacia un único receptor, lo que aproximaría a establecer la conformación tridimensional exacta necesaria para obtener afinidad únicamente por SSTR2.

Capítulo VI.

Análogos de somatostatina polisustituidos.

6.1 Introducción.

La potenciación de la interacción entre residuos aromáticos en presencia de piridilalaninas ha quedado demostrada en los anteriores capítulos. Gracias a su distribución de densidad de electrones única tanto en la nube π electrónica como en la periferia del anillo, se incrementan las fuerzas electrónicas que intervienen en las interacciones aromáticas,¹ lo cual conlleva, además, un aumento de la restricción conformacional de los péptidos.

Para finalizar el estudio correspondiente a los análogos de somatostatina que incluyen 3'Pya y 4'Pya en su estructura, se planteó la necesidad de conocer el efecto de aumentar la interacción aromática en estructuras con una arquitectura tridimensional en la cual se enfrentan los residuos 6 y 11 por una de las caras del péptido. Esto conllevaba sustituir la Phe7 por Msa y, además, sustituir la última fenilalanina en la secuencia por un aminoácido no natural de elevada densidad electrónica π en su anillo. Para tal fin, se escogió a la L- β -3',4',5'-trimetilfenilalanina (Tmp) (figura 6.1).

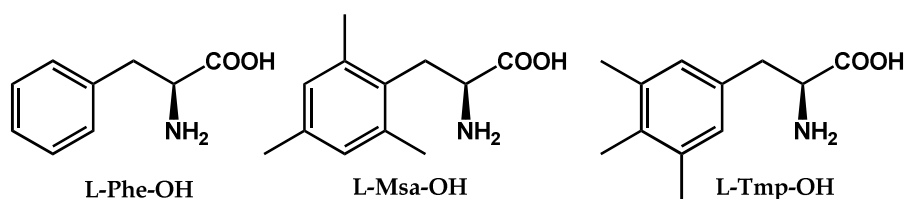


Figura 6.1. Estructuras de los aminoácidos L-Phe-OH, L-Msa-OH y L-Tmp-OH.

Como isómero constitucional de la Msa, la Tmp eleva la riqueza electrónica de su anillo gracias a la cesión por inducción de densidad de electrones, procedente de sus tres grupos metilos unidos directamente al anillo (figura 6.2).

La razón principal que motivó el uso de Tmp fue el reparto de sus metilos, disminuyendo el impedimento estérico respecto al que provocaría la Msa. Teniendo en cuenta la orientación típica del par 6-11 en las estructuras previamente estudiadas, es de esperar que se facilite un acercamiento disponiendo la presencia de los grupos metilo a posiciones meta y para del anillo,

¹ C. A. Hunter, K. R. Lawson, J. Perkins, C. J. Urch, *J. Chem. Soc. Perkin. Trans.*, **2001**, 5, 651-669.

en vez de orto y para como ocurriría con el uso de Msa. De hecho, en la tesis doctoral de Pablo Antonio Martín-Gago² se comprobó el impacto desfavorable que la presencia de Msa en posiciones 6 u 11 cuando se enfrentan a Dfp.

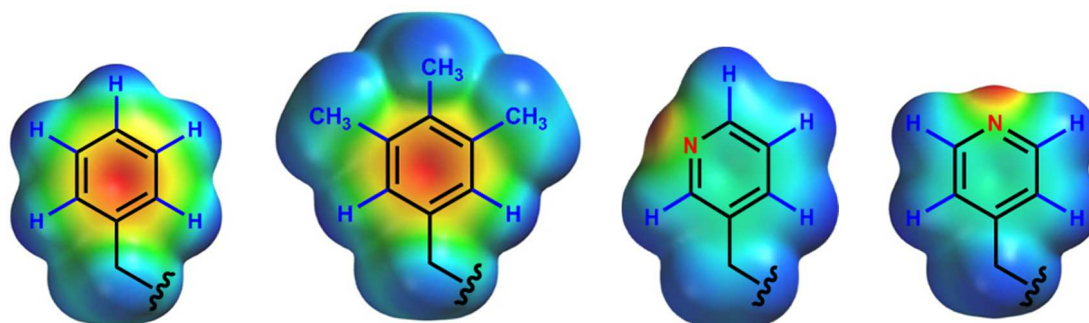


Figura 6.2. Comparación de las densidades electrónicas y el entorno estérico de los anillos aromáticos de Phe, Tmp, 3'Pya y 4'Pya, de izquierda a derecha. Azul = densidad electrónica baja. Rojo = densidad electrónica alta. Cálculo en Spartan (semi-empírico AM1).³

Los acercamientos entre 3'Pya o 4'Pya con Phe quedaban marcados, mayoritariamente, por una geometría *edge-to-face*. Sin embargo, al incluir tres restos metilo en el anillo, esperamos que este tipo de interacción quede desfavorecida, y se trate, mayoritariamente, de un acercamiento *face-to-face* u *offset-stacked* (figura 6.3), más similares a los obtenidos con la familia de la Dfp.

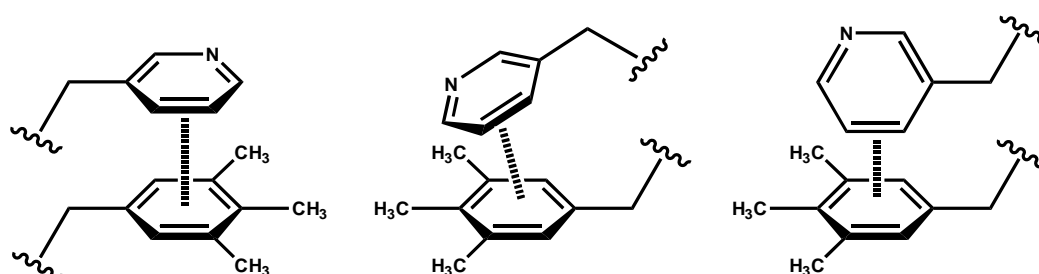


Figura 6.3. Tipo de interacciones aromáticas esperadas entre un anillo pobre en electrones de la 3'Pya y uno rico en electrones de la Tmp: *face-to-face* paralela (izquierda), *face-to-face* con inclinación de uno de los anillos (centro) y *edge-to-face* (derecha).

El objetivo planteado en este capítulo es el estudio de derivados polisustituidos, que incluyan en su estructura restos de mesitilalanina, piridilalanina, trimetilfenilalanina y D-triptófano. Al forzar el acercamiento de

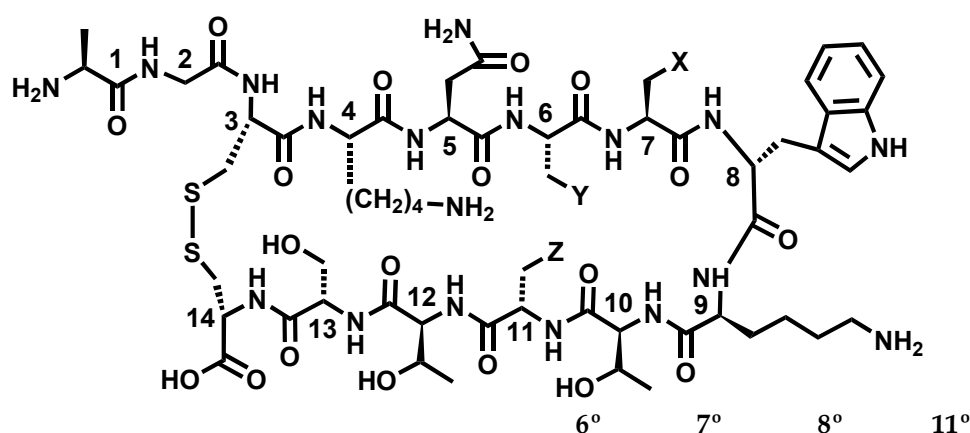
² P. A. Martín-Gago, tesis doctoral *Synthesis of highly structured and receptor-selective tetradecapeptidic analogs of somatostatin: Fine-tuning the non-covalent interactions among their aromatic residues*, Universidad de Barcelona, 2013.

³ Spartan '10 v. 1.1.0 (Wavefunction).

los aminoácidos en posiciones sexta y undécima al incluir Msa7 en su secuencia,^{2,4} esperamos que la suma de efectos de un anillo pobre en electrones junto a un residuo rico en electrones aumente la fuerza de interacción aromática, para dar estructuras tetradecapeptídicas con la mayor rigidez posible. A su vez, comprobaremos cómo varía la geometría de la interacción aromática entre los anillos 6 y 11 y su relación con el resto del péptido, y si esto se traslada a instaurar un nuevo perfil de actividad biológica frente a SSTR1-5.

6.2. Síntesis de análogos de somatostatina con L-β-4'-piridilalanina.

Tomando como base los péptidos [L-3'Pya6_L-Msa7_D-Trp8]-SST (10), [L-3'Pya11_L-Msa7_D-Trp8]-SST (11), [L-4'Pya6_L-Msa7_D-Trp8]-SST (15) y [L-4'Pya11_L-Msa7_D-Trp8]-SST (16), se diseñaron cuatro análogos que contuviesen Tmp en las posiciones 6 y 11. Así, fueron sintetizados los péptidos [L-3'Pya6_L-Msa7_D-Trp8_L-Tmp11]-SST (17), [L-3'Pya11_L-Msa7_D-Trp8_L-Tmp6]-SST (18), [L-4'Pya6_L-Msa7_D-Trp8_L-Tmp11]-SST (19) y [L-4'Pya11_L-Msa7_D-Trp8_L-Tmp6]-SST (20) (tabla 6.1).

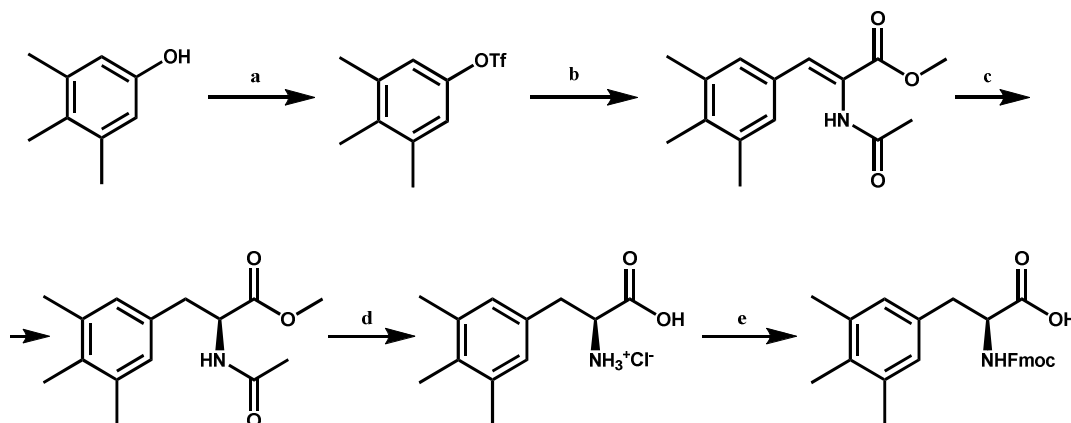


	6°	7°	8°	11°
[L-3'Pya6_L-Msa7_D-Trp8_L-Tmp11]-SST (17)	3'Pya	Msa	D-Trp	Tmp
[L-3'Pya11_L-Msa7_D-Trp8_L-Tmp6]-SST (18)	Tmp	Msa	D-Trp	3'Pya
[L-4'Pya6_L-Msa7_D-Trp8_L-Tmp11]-SST (19)	4'Pya	Msa	D-Trp	Tmp
[L-4'Pya11_L-Msa7_D-Trp8_L-Tmp6]-SST (20)	Tmp	Msa	D-Trp	4'Pya

Tabla 6.1. Derivados de somatostatina polisustituidos presentados en este capítulo.

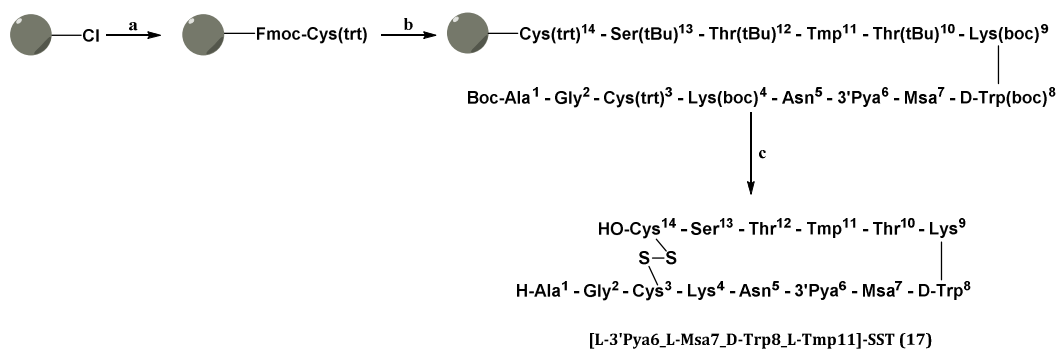
⁴ P. Martín-Gago, M. Gómez-Caminals, R. Ramón, X. Verdaguer, P. Martín-Malpartida, E. Aragón, J. Fernández-Carneado, B. Ponsati, P. López-Ruiz, M. A. Cortés, B. Colás, M. J. Macías, A. Riera, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2012**, *51*, 1820-1825.

La síntesis de Fmoc-Msa-OH se realizó según los métodos diseñados previamente en nuestro grupo.^{2,4} La Fmoc-Tmp-OH fue sintetizada según los protocolos desarrollados por el Dr. Martín-Gago,^{2,5} siguiendo una ruta sintética mostrada en el esquema 6.1. Los aminoácidos no naturales L-3'Pya-OH, L-4'Pya-OH y D-Trp(boc)-OH fueron adquiridos comercialmente.



Esquema 6.1. Síntesis de Fmoc-L-Tmp-OH. a. $\text{ Tf}_2\text{O}$, $\text{ Et}_3\text{N}$, $\text{ CH}_2\text{Cl}_2$, 4h, -15°C ; b. N-Ac-dehidro-Ala-OMe, tri-*o*-tolilfosfina, $\text{ Pd}(\text{OAc})_2$, LiOH , $\text{ Et}_3\text{N}$, $\text{ CH}_3\text{CN}$, 10 h, 100°C ; c. MaxPHOS-Rh cat 3%, H_2 (5 bar), MeOH , r.t.; d. HCl aq, 6h, reflujo; e. FmocOSu, $\text{ Na}_2\text{CO}_3$, $\text{ H}_2\text{O}$, acetona, 0° a r.t.

Los análogos peptídicos se realizaron siguiendo el protocolo de síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS) mediante la estrategia Fmoc/^tBu en resina 2-clorotritil cloruro (esquema 6.2).⁶



Esquema 6.2. Ejemplo de síntesis, péptido 17. a) 1. Fmoc-L-Cys(trt)-OH (3 eq), DIEA (3 eq), 2. MeOH ; b) 1. Piperidina 20% DMF , 2. Fmoc-Aaa-OH (1.5-3 eq), DIPCIDI (3 eq), HOBT (3 eq), DMF (x12), 3. Piperidina 20% DMF , 4. Boc-Ala-OH, DIPCIDI (3 eq), HOBT (3 eq), DMF ; c) 1. $\text{ CH}_2\text{Cl}_2/\text{ TFE}/\text{ AcOH}$, 2. I_2 , 3. $\text{ TFA}/\text{ CH}_2\text{Cl}_2/\text{ anisol}/\text{ H}_2\text{O}$.

⁵ E. Cristóbal-Lecina, P. Etayo, S. Doran, M. Revés, P. Martín-Gago, A. Grabulosa, A. R. Costantino, A. Vidal-Ferrán, A. Riera, X. Verdaguer, *Adv. Synth. Catal.*, **2014**, 356, 795-804.

⁶ G. B. Fields, R. L. Noble, *Int. J. Protein Res.*, **1990**, 35, 161-214.

6.3. Ensayos biológicos.

Los perfiles de actividad frente a SSTR1-5 se analizaron para todos los derivados siguiendo el protocolo establecido por Reisine y colaboradores,⁷ llevados a cabo externamente por la compañía Eurofins Scientific.⁸ Los resultados se muestran en la tabla 6.2, expresando los resultados como Ki.

	SSTR1 (nM)	SSTR2 (nM)	SSTR3 (nM)	SSTR4 (nM)	SSTR5 (nM)
SST14	1,88	0,016	0,25	1,55	0,76
Octreótido	480	0,77	13,0	>1000	21,0
[L-3'Pya6_L-Msa7_D-Trp8_L-Tmp11]-SST (17)	38,0	0,21	7,87	170	94
[L-3'Pya11_L-Msa7_D-Trp8_L-Tmp6]-SST (18)	88,0	0,42	27,0	97,0	93,0
[L-4'Pya6_L-Msa7_D-Trp8_L-Tmp11]-SST (19)	100	0,71	91,0	>1000	>100
[L-4'Pya11_L-Msa7_D-Trp8_L-Tmp6]-SST (20)	53,0	0,34	6,94	67,0	56,0

Tabla 6.2. Datos de afinidad frente a los SSTR1-5.

Estos derivados muestran, en cuanto a su perfil de actividad, una clara preferencia por SSTR2, aunque no alcancen el orden de unión de la SST. Todos ellos demuestran una baja unión con el resto de receptores, más acentuado en el caso de SSTR1, SSTR4 y SSTR5. Tras analizar las estructuras de estos péptidos, se volverá sobre los resultados para, una vez más, trazar una pauta de comportamiento en función de sus sustituciones, su disposición tridimensional y la actividad biológica que exhiben.

6.4. Estructura.

Como en anteriores capítulos, estos cuatro derivados fueron estudiados mediante técnicas de RMN para obtener los correspondientes espectros bidimensionales homonucleares ¹H-¹H TOCSY y NOESY,⁹ medido en medio acuoso a un pH de 6,5, cercano al fisiológico. Siguiendo el protocolo descrito en la sección 3.4, con la información de integración de las señales NOE extraída de estos espectros bidimensionales, e introducida en el programa de cálculo cálculo

⁷ S. Rens-Domiano, S. F. Law, Y. Yamada, S. Seino, G. I. Bell, T. Reisine, *Mol. Pharmacol.*, **1992**, *42*, 28-34.

⁸ Eurofins Panlabs Inc., de Eurofins Scientific.

⁹ K. Wuethrich, G. Wider, G. Wagner, W. Braun, *J. Mol. Biol.*, **1982**, *155*, 311-319.

CNS¹⁰ mediante la interfaz StrutCalc,¹¹ lanzando un número variable de cálculos se obtuvieron en todos los casos estructuras de baja energía con un alto grado de convergencia, coherentes a las señales de los espectros y a los ángulos diedros permitidos según los diagramas de Ramachandran.¹²

Aparte de la restricción impuesta por el D-Trp8,¹³ L-Msa7,^{2,4} L-3'Pya (Capítulo IV) y L-4'Pya (Capítulo V), al incluir L-Tmp en la estructura se aprecia un aumento aún mayor en la ordenación del péptido, dada la gran cantidad de señales NOE detectadas. Los H δ aromáticos de la Tmp se encuentran cercanos a los H ϵ de la Msa, incluso todavía más apantallados (figura 6.4), y sus protones metílicos aportan un aumento cuantitativo importante de señales en el espectro.

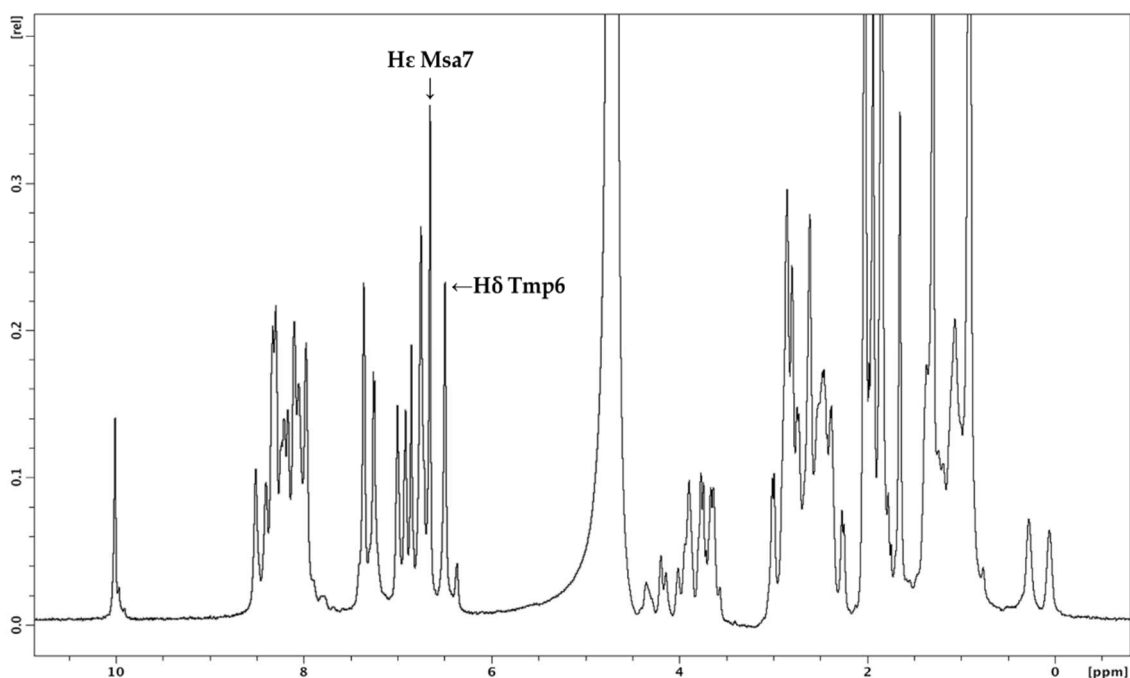


Figura 6.4. Desplazamientos químicos de H δ en Tmp6 (6,50 ppm) y H ϵ de Msa7 (6,66 ppm) en el análogo [L-4'Pya11_L-Msa7_D-Trp8_L-Tmp6]-SST (**20**).

¹⁰ A. T. Brunger, P. D. Adams, G. M. Clore, W. L. DeLano, P. Gros, R. W. Grosse-Kunstleve, J. S. Jiang, J. Kuszewski, M. Nilges, N. S. Pannu, R. J. Read, L. M. Rice, T. Simonson, G. L. Warren *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **1998**, *54*, 905-921.

¹¹ P. Martín-Malpartida, M. J. Macías, datos sin publicar.

¹² G. N. Ramachandran, C. Ramakrishnan, V. Sasisekharan, *J. Mol. Biol.*, **1963**, *7*, 95-99.

¹³ a) B. H. Arison, R. Hirschmann, D. F. Veber, *Bioorg. Chem.*, **1978**, *7*, 447 - 451; b) O. Ovadia, S. Greenberg, B. Laufer, C. Gilon, A. Hoffman, H. Kessler, *Expert Opin. Drug Discovery*, **2010**, *5*, 655 - 671.

6.4.1. Análogo [L-3'Pya6_L-Msa7_D-Trp8_L-Tmp11]-SST (17).

El primer análogo de somatostatina polisustituido que hemos estudiado, [L-3'Pya6_L-Msa7_D-Trp8_L-Tmp11]-SST (17), presenta una estructura altamente mayoritaria convergente (figura 6.5)¹⁴ en la que se observa un ordenamiento espacial muy similar a la del péptido 10, su homólogo sin Tmp11, con contactos NOE semejantes.

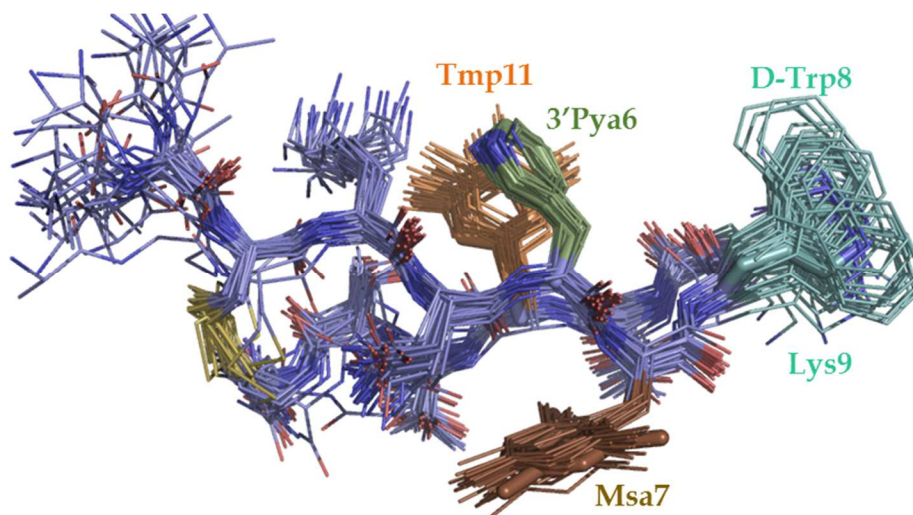


Figura 6.5. Superposición de las 25 estructuras de menor energía de [L-3'Pya6_L-Msa7_D-Trp8_L-Tmp11]-SST (17) según los datos experimentales de RMN.

En esta estructura, se acercan ambos anillos mediante una geometría *face-to-face* mostrando un ángulo de inclinación, quedando alejado el nitrógeno aromático de 3'Pya6 del anillo rico en electrones de la Tmp11. En 10, la periferia de Phe11 se acercaba a la cara de 3'Pya6 de forma *edge-to-face*; en este caso, sería inviable por el impedimento estérico de los metilos de Tmp11, así que 3'Pya se desplaza de forma que ambas nubes π , una empobrecida y la otra enriquecida electrónicamente, quedan cercanas en el espacio. En sus espectros bidimensionales se detectan contactos entre los H δ aromáticos de Tmp11 con los H δ 1 y H δ 2 aromáticos de 3'Pya6; también, se observan interacciones NOE entre

¹⁴ Principales señales NOE que satisfacen esta estructura: a) H ϕ de Msa7 con H δ 21 y H δ 22 de Asn5. b) H η de Msa7 con H δ 21 y H δ 22 de Asn5. c) H ϵ de Msa7 con H β 2, H β 3 de Asn5; H β y H γ de Thr12. d) H δ de Tmp11 con H α , H β 2, H β 3, H δ 1, H δ 2, H ϵ y H ζ de 3'Pya6. e) H δ 1 de 3'Pya6 con H α , H β 3 y H ϕ de Tmp11. f) H δ 2 de 3'Pya6 con H β 2, H β 3, H ϕ y H η de Tmp11.

Señales NOE que no satisfacen esta estructura, detectadas en el espectro bidimensional: a) H δ de D-Trp8 con H ϕ y H η de Msa7.

los hidrógenos metílicos del primero con los H_{AR} del segundo. La orientación de Msa7 queda paralela al avance del esqueleto peptídico, apuntando su metilo en posición para en dirección al puente disulfuro. Por último, el dúo D-Trp8_Lys9 se resuelve parcialmente en esta estructura, debido a la ausencia de suficientes señales NOE con el resto de cadenas laterales de la secuencia.

6.4.2. Análogo [L-3'Pya11_L-Msa7_D-Trp8_L-Tmp6]-SST (18).

El siguiente péptido estudiado, [L-3'Pya11_L-Msa7_D-Trp8_L-Tmp6]-SST (18), cuenta con un ordenamiento muy parecido al de 17, observando el par Tmp6-3'Pya11, el dueto D-Trp8_Lys9 y la Msa7 orientada por la cara contraria a donde se encuentran los otros dos anillos aromáticos (figura 6.6).¹⁵

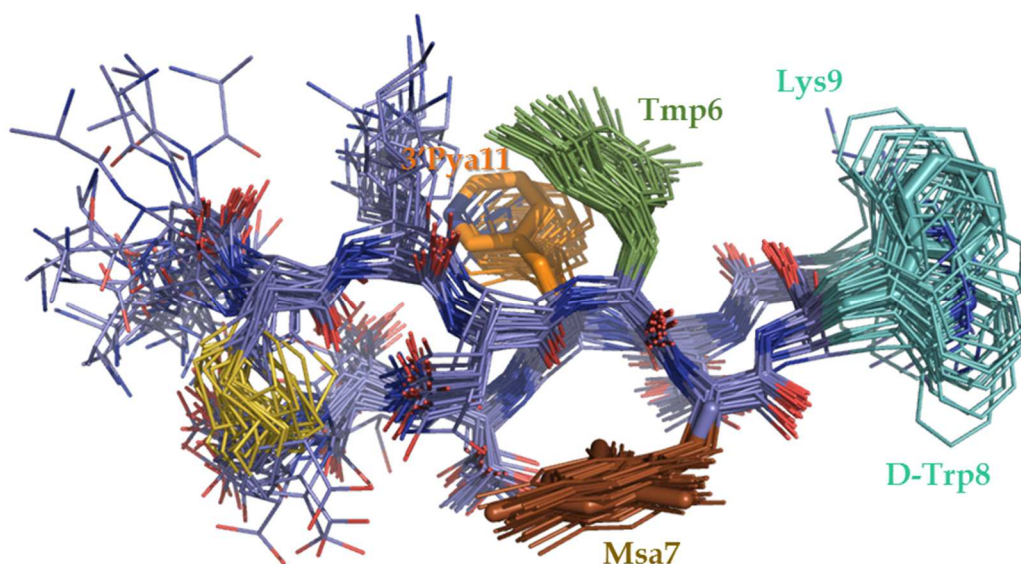


Figura 6.6. Superposición de las 25 estructuras de menor energía de [L-3'Pya11_L-Msa7_D-Trp8_L-Tmp6]-SST (18) según los datos experimentales de RMN.

En este caso, y siguiendo el patrón más clásico de la familia de la 3'Pya, el acercamiento entre el residuo piridilo y el Tmp se produce de manera *edge-to-face* de 11 sobre 6, tal como se infiere de las conectividades NOE entre hidrógenos de ambos residuos. Así, la 3'Pya no tiene problemas al acercar su borde contrario al

¹⁵ Principales señales NOE que satisfacen esta estructura: a) **Hδ21 de Asn5** con H_η de Msa7; H_γ de Thr12. b) **Hε de Msa7** con H_{β2}, H_{β3} de Asn5; H_γ de Thr10; H_β y H_γ de Thr12. c) **Hδ1 de 3'Pya11** con H_δ, H_φ y H_η de Tmp6. d) **Hε de 3'Pya11** con H_φ y H_η de Tmp6.

Señales NOE que no satisfacen esta estructura: a) **Hδ de Tmp6** con H_φ de Msa7; H_γ de Thr10. b) **Hδ2 de 3'Pya11** con H_γ de Thr12.

N_{AR} a la cara del residuo trimetilfenilo, por lo que respetaría la regla vista en el capítulo IV en la cual se exponía que la presencia de 3'Pya en la estructura facilitaba una interacción de tipo *edge-to-face* entre 11 (acercando el borde) y 6 (exponiendo la cara), independientemente de la posición que la 3'Pya ocupe.

6.4.3. Análogo [L-4'Pya6_L-Msa7_D-Trp8_L-Tmp11]-SST (19).

El primero de los péptidos polisustituidos con 4'Pya en su estructura, [L-4'Pya6_L-Msa7_D-Trp8_L-Tmp11]-SST (19), presenta un grado de convergencia aún mayor que en los dos análogos vistos hasta ahora en este capítulo (figura 6.7).¹⁶ De nuevo es un ordenamiento espacial muy parecido al estudiado en el análogo 17, con una interacción de tipo *face-to-face* donde el residuo piridilo en posición 6 se inclina respecto a la cara π del aminoácido en 11, alejando de dicha nube electrónica el nitrógeno intracíclico. La orientación relativa de D-Trp8_Lys9 se resuelve más claramente respecto a los dos análogos anteriores, disponiéndose hacia la misma cara del par aromático.

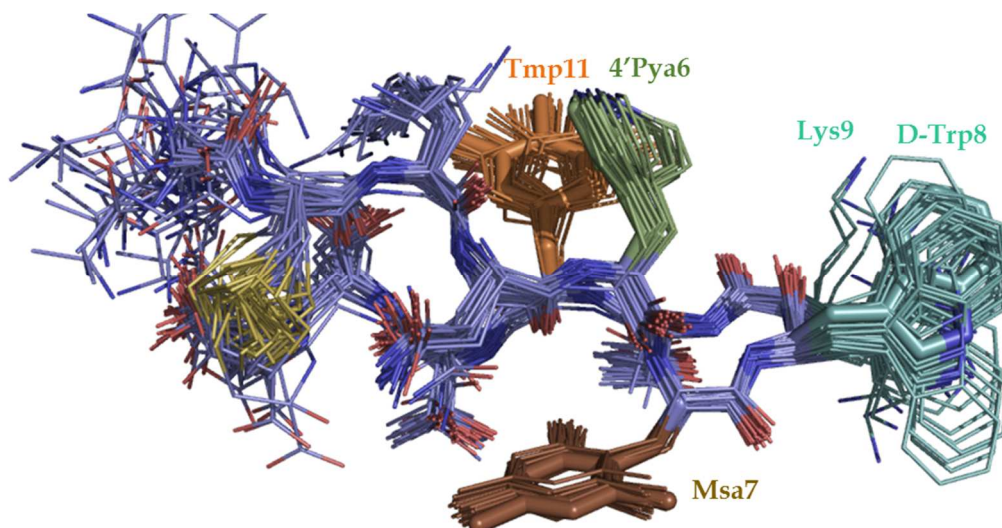


Figura 6.7. Superposición de las 25 estructuras de menor energía de [L-4'Pya6_L-Msa7_D-Trp8_L-Tmp11]-SST (19) según los datos experimentales de RMN.

¹⁶ Principales señales NOE que satisfacen esta estructura: a) **H ϕ de Msa7** con H δ 21 y H δ 22 de Asn5. b) **H η de Msa7** con H δ 21 y H δ 22 de Asn5. c) **H ϵ de Msa7** con H β 2, H β 3 de Asn5; H β y H γ de Thr12. d) **H δ de Tmp11** con H α , H β 2, H β 3 y H ϵ de 4'Pya6. e) **H δ de 4'Pya6** con H α , H β 2, H β 3, H ϕ y H η de Tmp11.

Señales NOE que no satisfacen esta estructura: a) **H γ de Thr10** con HN de Cys14. b) **H γ de Thr12** con H δ de 4'Pya6; HN de Cys14.

6.4.4. Análogo [L-4'Pya11_L-Msa7_D-Trp8_L-Tmp6]-SST (20).

El último análogo de SST polisustituido, [L-4'Pya11_L-Msa7_D-Trp8_L-Tmp6]-SST (20), presenta un menor nivel de convergencia entre sus estructuras de menor energía, difiriendo a las anteriores estructuras (figura 6.8).¹⁷ Se muestra una arquitectura menos resuelta en la cual se produce una interacción de tipo *edge-to-face* entre el residuo 4'Pya11, que acerca su periferia a la cara π de Tmp6. A diferencia de 18, el acercamiento que profesan ambos anillos es más perpendicular.

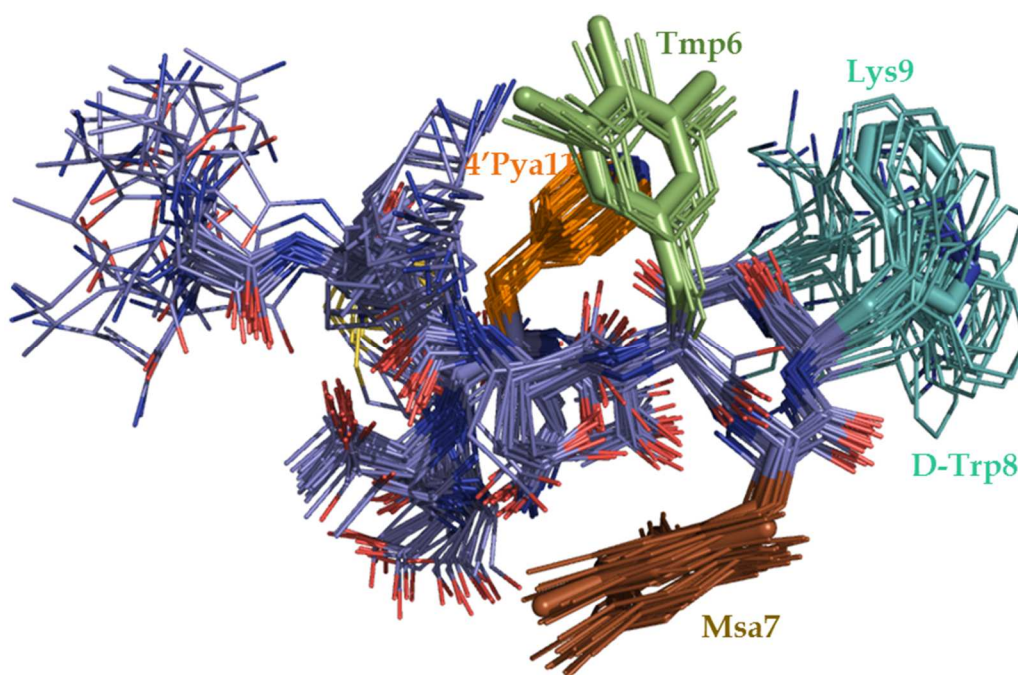


Figura 6.8. Superposición de las 25 estructuras de menor energía de [L-4'Pya11_L-Msa7_D-Trp8_L-Tmp6]-SST (20) según los datos experimentales de RMN.

6.4.5. Discusión.

Aunque en los cuatro péptidos estudiados en este capítulo se aprecian estructuras de elevada rigidez, el aumento cualitativo obtenido en esta característica dista de ser el esperado. En todos los casos, se observan estructuras resueltas que permiten determinar con certeza qué disposición tridimensional

¹⁷ Principales señales NOE que satisfacen esta estructura: a) **H ϕ** de Msa7 con H δ 21 y H δ 22 de Asn5. b) **H η** de Msa7 con H δ 21 y H δ 22 de Asn5. c) **H ϵ** de Msa7 con H β 2, H β 3 de Asn5; H β y H γ de Thr10; H β y H γ de Thr12. d) **H δ** de 4'Pya11 con H β 2, H δ , H ϕ y H η de Tmp6. e) **H ϵ** de 4'Pya11 con H β 2, H δ y H ϕ de Tmp6. Señales NOE que no satisfacen esta estructura: a) **H δ 1** de D-Trp8 con H ϕ y H η de Msa7.

mayoritaria presentan en disolución. En todos los casos, presentan una disposición tridimensional muy semejante, que dista de lo visto en anteriores capítulos donde resultaba predecir un patrón común de comportamiento entre péptidos homólogos.

Cuando la Tmp es ubicada en posición 11, se producen tanto en **17** como en **19** acercamientos de tipo *face-to-face*, con el residuo piridilo formando un cierto ángulo al acercar su nube π de electrones al del residuo de mayor densidad electrónica. Este acercamiento se vería facilitado tanto por la menor repulsión que se daría entre ambas caras aromáticas al modificarse sus niveles de densidad π , así como el impedimento estérico impuesto por los tres metilos en el anillo de Tmp. Mientras, **18** y **20** presentan en sus acercamientos geometrías de carácter *edge-to-face*, donde los restos piridilos acercan su periferia, pobre en electrones, a la cara π del Tmp. Llama la atención sobre todo en **20**, que al ver las características de los otros péptidos que incluyen 4'Pya11, [L-4'Pya11_D-Trp8]-SST (**14**) y [L-4'Pya11_L-Msa7-D-Trp8]-SST (**16**), demuestra que es un caso en el que es difícil predecir los efectos que tendrá la inclusión de varios aminoácidos aromáticos no naturales en la secuencia de SST.

Todos los derivados presentados en este capítulo presentan una alta selectividad por SSTR2, pero sin llegar a los valores de unión de la SST nativa. A pesar de contar con una orientación bien definida y cercana en el espacio, no se alcanzan los valores vistos en el capítulo V, con la familia de la 4'Pya. Es posible que el tamaño del anillo de Tmp esté dificultando la unión con este receptor, dado el volumen espacial de sus tres grupos metilo en la posición más distal.

Es significativo como, una vez más, la presencia de Msa7 reduce considerablemente la afinidad por SSTR4 y SSTR5; se ha de tratar de una característica intrínseca a la presencia de un anillo rico en electrones e/o impedido estéricamente, que desfavorezca de alguna forma la unión con este receptor. El hecho de que este patrón se haya repetido en todas las familias de péptidos, analizadas en la presente tesis, nos ha ayudado a un mejor

entendimiento de las implicaciones que tiene la sustitución de la fenilalanina en séptima posición por este aminoácido no natural.

Al mismo tiempo la afinidad por SSTR1 en los cuatro casos se encuentra bastante menguada respecto a la hormona nativa. Según lo analizado en anteriores capítulos, es bastante posible que la presencia del anillo de la Tmp, altamente denso en electrones y de elevado volumen espacial, dificulte la unión con este receptor, cuyo vínculo se vería incrementado por zonas de interacción aromática de pobreza electrónica.

Por último, en ninguno de estos derivados se presta una conformación tridimensional adecuada para conseguir una elevada asociación con SSTR3, dado que no existe un acercamiento espacial entre tres anillos aromáticos.

6.5. Conclusiones.

El diseño de análogos polisustituidos permite obtener estructuras muy semejantes para los cuatro casos estudiados (geometrías de aproximación 6-11), que además cuentan con unos perfiles de afinidad y selectividad parecidos. Cuando el aminoácido Tmp se encuentra en posición 11 (análogos 17 y 19), se favorecen acercamientos de tipo *face-to-face*, mientras que los análogos que cuentan con Tmp en sexta posición (análogos 18 y 20) se ve fomentada una geometría de tipo *edge-to-face*.

Aunque no se alcanzan los valores de K_i por SSTR2 que presenta la somatostatina, al decrecer considerablemente la afinidad por el resto de receptores permite obtener unos perfiles de actividad interesantes, al ser selectivos por este receptor.

Una vez más, la inclusión de Msa7 disminuye considerablemente la afinidad por SSTR4 y SSTR5. La explicación a este fenómeno podría residir en las características intrínsecas de esa posición en su unión con dichos receptores. Al ser un evento común en todos los péptidos estudiados de la familia de la SST, demostramos que será un efecto seguro a la Msa7 y no fruto del azar.

Se ha comprobado que esta familia de análogos polisustituidos presenta una afinidad disminuida frente a SSTR1 y SSTR3. La presencia de un anillo rico en electrones, en la interacción clásica 6-11 de estas estructuras, explicaría la escasa unión por SSTR1, y la ausencia de un triunvirato aromático, fuese formado por un clúster o por cercanía espacial con el D-Trp8, la baja afinidad por SSTR3.

Por tanto, hemos observado cómo se repiten patrones de comportamiento estudiados y analizados en anteriores capítulos, con esta última familia de péptidos derivados de la somatostatina.

Capítulo VII.

Análogos de cortistatina.

7.1. Introducción.

La cortistatina (CST) es una hormona peptídica descubierta en 1996, aislada por vez primera en especies murinas y, un año más tarde, en humanos.¹ Se trata de un neuropéptido cortical de la familia de la somatostatina, con una secuencia de aminoácidos muy similar a ésta (figura 7.1).

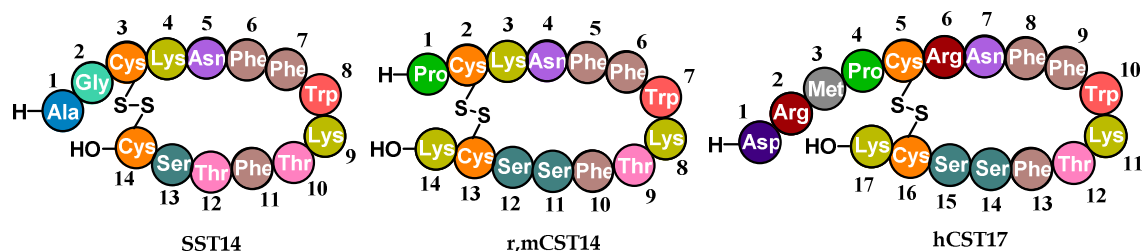


Figura 7.1. Secuencia de somatostatina humana, cortistatina murina y cortistatina humana.

Esta hormona se encuentra muy estudiada en las especies de mamíferos rata (*Rattus norvegicus*), ratón (*Mus musculus*) y humanos. La nomenclatura de los distintos derivados se define por el número de residuos de la hormona final, y precedido de una consonante que define el organismo: *r* para rata, *m* para ratón y *h* para humana. En rata, la maduración de la prepro-rCST se realiza mediante fragmentaciones sucesivas de la secuencia inicial en zonas dibásicas de corte, Lys-Arg y Lys-Lys. Esto da lugar a las versiones finales de hormona del extremo C-terminal, siendo los productos resultantes rCST14 y rCST29, de una manera similar a como ocurre en la prosomatostatina, la cual origina las secuencias SST14 y SST28. A su vez, en ratón las fragmentaciones producidas sólo producen la forma de mCST14, con la misma estructura que rCST14. Aunque la prepro-hCST también resulta en dos productos hCST17 y hCST29, en clara analogía a rCST y SST, el hecho de que rCST14 contenga el mismo número de residuos que SST14, e intracíclicamente sea más similar, han hecho que sea el péptido de elección para llevar a cabo los estudios relacionados con cortistatina.²

¹ a) L. de Lecea, J. R. Criado, Ó. Próspero-García, K. M. Gautvik, P. Schweitzer, P. E. Danielson, C. L. M. Dunlop, G. R. Siggins, S. J. Henriksen, J. G. Sutcliffe, *Letters to Nature*, **1996**, *381*, 242-245; b) L. de Lecea, P. Ruiz-Lozano, P. E. Danielson, J. Peelle-Kirley, P. E. Foye, W. N. Frankel, J. G. Sutcliffe, *Genomics*, **1997**, *42*, 499-506.

² A. D. Spier, L. de Lecea, *Brain Res. Rev.*, **2000**, *33*, 228-241.

La semejanza de secuencia entre SST y CST viene definida por la semejanza de sendos genes a nivel de expresión de péptido, localizados en los cromosomas humanos 3 y 1 respectivamente. Se ha postulado que ambos genes provienen de un precursor ancestral: en algún punto evolutivo, posiblemente durante la evolución temprana de los vertebrados, la región donde dicho precursor se encontrase sufrió una duplicación y posterior evolución paralela. Dicha teoría explicaría también la presencia de genes emparentados en las regiones cromosómicas vecinas a CST y SST, como ocurre con los genes codificantes de urotensina II (UII) y el péptido relacionado con urotensina II (URP).³ Las acciones farmacológicas de SST, tales como liberación y regulación de la hormona de crecimiento (GH), insulina, glucagón, secreción gástrica mediada por gastrina, o movilidad intestinal, eran fielmente reproducidas mediante la administración exógena de CST14. Como estaba previsto, el perfil farmacológico *in vitro* de CST14 frente a los SSTR1-5 es análogo al dado por SST14.⁴

En humanos, la SST14 tiene una distribución homogénea entre tejidos. Aunque en un principio se determinó que la distribución y expresión endógena detectada de CST17 no era equivalente a SST14, dado que su expresión se detectó esencialmente en corteza e hipocampo,^{2,5} posteriormente se descubrió que células endocrinas periféricas eran capaces de producir y liberar CST17 (tracto digestivo, páncreas endocrino y glándula paratiroidea).⁶

³ a) P. Dehal, J. L. Boore, *PLoS Biol.*, **2005**, 3, 1700-1708; b) H. Tostivint, L. Joly, I. Lihmann, C. Parmentier, A. Lebon, M. Morillon, A. Calas, M. Ekker, H. Vaudry, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2006**, 103, 2237-2242; c) H. Tostivint, I. Lihmann, H. Vaudry, *Mol. Cell. Endocrinol.*, **2008**, 286, 5-17.

⁴ a) S. Fukusumi, C. Kitada, S. Takekawa, H. Kizawa, J. Sakamoto, M. Miyamoto, S. Hinuma, K. Kitano, M. Fujino, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1997**, 232, 157-163; b) J. R. Criado, H. Li, X. Jiang, M. Spina, S. Huitrón-Reséndiz, G. Liapakis, M. Calbet, S. Siehler, S. J. Henriksen, G. Koob, D. Hoyer, J. G. Sutcliffe, M. Goodman, L. de Lecea, *J. Neurosci. Res.*, **1999**, 56, 611-619; c) S. Siehler, C. Nunn, J. Hannon, D. Feuerbach, D. Hoyer, *Mol. Cell. Endocrinol.*, **2008**, 286, 26-34; d) L. de Lecea, *Mol. Cell. Endocrinol.*, **2008**, 286, 26-34.

⁵ Y.C. Patel, *Front Neuroendocrinol.*, **1999**, 20, 157-198.

⁶ a) V. A. Dalm, P. M. Van Hagen, R. R. de Krijger, J. M. Kros, P. M. Van Koetsveld, A. J. Van Der Lely, S. W. Lamberts, L. J. Hofland, *Clin. Endocrinol.*, **2004**, 60, 625-629; b) E. Allia, E. Tarabra, M. Volante, M. Cerrato, E. Ghigo, G. Muccioli, M. Papotti, *J. Pathol.*, **2005**, 207, 336-345.

A nivel cortical, se fueron descubriendo una serie de acciones únicas no reproducibles por SST en presencia del mismo tejido. La primera identificada fue la inducción y aumento del sueño de fase IV (también conocido como fase de sueño de ondas lentas, de ondas delta o sueño profundo) sin aumentar la duración del sueño paradójico o REM, mediante la administración exógena intracerebroventricular moderada en modelos animales.¹ A dosis elevadas, la CST disminuye la duración de la fase REM, efecto antagónico a la administración de SST a dosis equivalentes,⁷ que aumenta la duración de dicha fase. Se postuló que esta serie de acciones eran debidas a la interferencia que provoca la CST en el sistema colinérgico regulador del sueño. Estos datos son consistentes con el hecho de que la privación de sueño prolongada provoca un aumento de la expresión de ARNm de preprocortistatina.⁸ Al mismo tiempo, se identificó la capacidad que la rCST14 tenía para provocar hipomovilidad, también a causa de su efecto anticolinérgico, que se traducía en un descenso de la actividad cortical¹. Se han identificado otra serie de acciones a nivel cerebral mediadas por CST, como protección frente a isquemia,⁹ memoria a largo plazo¹⁰ u otras acciones metabólicas como aumentar la secreción de prolactina.¹¹

Este espectro de acciones biológicas tan dispar llevó al planteamiento de la existencia de receptores sobre los que actuase la CST más allá de los SSTR1-5, e incluso un hipotético receptor específico de CST. El primer caso con el que se descubrió que la r,mCST14 y hCST17 presentaban afinidad que SST14 no tenía, fue con la familia de receptores secretagogos de GH, concretamente GHS-R1a, sensibles a grelina.¹² Aunque inicialmente se definió un perfil farmacológico de

⁷ M. Rezek, V. Havlicek, K. R. Hughes, H. Friesen, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **1976**, 5, 73-77.

⁸ C. Cirelli, U. Faraguna, G. Tononi, *J. Neurochem.*, **2006**, 98, 1632-1645.

⁹ C. Rauca, K. Schafer, V. Holtt, *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, **1999**, 360, 633-638.

¹⁰ a) J.F. Flood, K. Uezu, J. E. Morley, *Brain Res.*, **1997**, 775, 250-252; b) M. Sánchez-Álave, M. Gómez-Chavarin, L. Navarro, A. Jiménez-Anguiano, E. Murillo-Rodríguez, R. A. Prado-Alcalá, R. Drucker-Colin, O. Próspero-García, *Brain Res.*, **2000**, 858, 78-83.

¹¹ J. Córdoba-Chacón, M. D. Gahete, A. I. Pozo-Salas, A. J. Martínez-Fuentes, L. de Lecea, F. Gracia-Navarro, R. D. Kineman, J. P. Castaño, R. M. Luque, *Endocrinology*, **2011**, 152, 4800-4812.

¹² R. Deghenghi, M. Papotti, E. Ghigo, G. Muccioli, *J. Endocrinol. Invest.*, **2001**, 24, RC1-RC3.

unión entre grelina y CST14 semejante, en posteriores trabajos se determinó que *in vitro* es necesaria una concentración mucho mayor e, *in vivo*, no se pudo determinar un efecto agonista o antagonista sobre la secreción ácida en estómago a concentraciones donde la grelina actúa.¹³ Otro receptor específico para CST es el MrgX2, pero debido a su promiscuidad (se alcanzan elevadas tasas de unión con péptidos que presenten una triada de anillos aromáticos) y a la ausencia de su expresión en la región cortical, se puso en duda la significancia funcional que de esta unión pudiese salir.¹⁴ La formación de heterodímeros de SSTR, el uso de moléculas accesorias, o la existencia de uno o varios subtipos de SSTR aún no identificados serían otras explicaciones posibles a la diferencia de acciones biológicas entre CST y SST.¹⁵

Es precisamente en esta dirección hacia donde están apuntando estudios más recientes del papel de la CST17 en tejidos periféricos.¹⁶ A parte de la secreción endocrina anteriormente citada, se ha demostrado una relación entre rCST29 y la señalización de la nocicepción mediada por neuronas nociceptivas peptidérgicas de los ganglios de la raíz dorsal en respuesta a estímulos inflamatorios y nocivos (mediados por receptores SSTR2 no activos frente a SST),¹⁷ así como el papel de hCST17 en diferenciación celular de células del sistema inmune e inflamación, mediante procesos de estimulación autocrina.¹⁸

¹³ V. Sibilia, G. Muccioli, R. Deghenghi, F. Pagani, V. De Luca, D. Rapetti, V. Locatelli, C. Netti, *J. Neuroendocrinol.*, **2006**, *18*, 122-128.

¹⁴ H. P. Nothacker, Z. Wang, H. Zeng, S. K. Mahata, D. T. O'Connor, O. Civelli, *Eur. J. Pharmacol.*, **2005**, *519*, 191-193.

¹⁵ a) M. Rocheville, D. C. Lange, U. Kumar, R. Sasi, R. C. Patel, Y. C., Patel, *J. Biol. Chem.*, **2000**, *275*, 7862-7869; b) M. Pfeiffer, T. Koch, H. Schroder, M. Klutzny, S. Kirscht, H. J. Kreienkamp, V. Hollt, S. Schulz, *J. Biol. Chem.*, **2001**, *276*, 14027-14036; c) D. L. Hay, D. R., Poyner, P. M., Sexton, *Pharmacol. Ther.*, **2006**, *109*, 173-197; d) N. Aourz, J. Portelli, J. Coppens, D. de Bundel, G. di Giovanni, A. van Eeckhaut, Y. Michotte, I. Smolders, *CNS Neurosci. Ther.*, **2014**, *20*, 662-670.

¹⁶ a) A. P. Heaney, S. Melmed, *Nat. Rev. Cancer*, **2004**, *4*, 285-295; b) M. C. de Martino, L. J. Hofland, S. W. Lamberts, *Prog. Brain Res.*, **2010**, *182*, 255-280; c) J. P. Castaño, A. Sundin, H. R. Maecke, C. Villabona, R. Vázquez-Albertino, E. Navarro, K. Öberg, *Cancer Metast. Rev.*, **2014**, *33*, 353-359.

¹⁷ M. Morell, M. Camprubí-Robles, M. D. Culler, L. de Lecea, M. Delgado, *Neurobiol. Dis.*, **2014**, *63*, 141-154.

¹⁸ a) V. A. Dalm, P. M. van Hagen, P. M. van Koetsveld, S. Achilefu, A. B. Houtsmuller, D. H. Pols, A. J. van der Lely, S. W. Lamberts, L. J. Hofland, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **2003**, *285*, 344-353 b) V. A.

Este papel antiinflamatorio ha sido uno de los que han atraído la atención, como potencial inmunomodulador endógeno, lo que incluiría en su espectro de acción enfermedades inflamatorias como la enfermedad de Crohn (EC).

La enfermedad de Crohn está englobada dentro de la enfermedad inflamatoria intestinal (EII). La EII es una denominación utilizada para una gama de enfermedades crónicas e idiopáticas que se caracterizan por ser provocadas por una disfunción de las células T de mucosa, alteraciones en la producción de citoquinas e inflamación, es decir, alteraciones en el sistema inmune, que acaba cursando con la destrucción de tejido, concentrado principalmente en la zona distal del intestino delgado y colon. En concreto, la EC presenta inflamación y destrucción del tejido de intestino delgado mayoritariamente (aunque, en menor proporción poblacional, se manifiesta en otras zonas), mediada por células T *helper* (Th1), en teoría debido a un fallo en la atenuación de la respuesta del sistema inmune a antígenos endógenos. Se produce una amplia gama de manifestaciones intra y extraintestinales, incluyendo dolor abdominal, diarrea, enfermedad de los ojos, sangrado rectal, etcétera. Los tratamientos actuales, entre los que se incluyen, de menor a mayor intensidad, cambio de hábitos de vida, el uso de medicación inespecífica como anticuerpos monoclonales (infliximab o adalimumab), azatioprina, ácido 5-aminosalicílico o metotrexato, y extirpación quirúrgica de la zona intestinal afectada, únicamente tienen un efecto paliativo y/o preventivo, pero en ningún caso suponen una erradicación definitiva de la enfermedad.¹⁹

Los estudios llevados a cabo por Mario Delgado y colaboradores²⁰ dan a la CST un importante papel en la regulación de esta enfermedad. Así, la rCST14 (y no SST14) era efectiva en el tratamiento de la inflamación intestinal en el

Dalm, P. M. van Hagen, P. M. van Koetsveld, A. W. Langerak, A.J. van der Lely, S.W. Lamberts, L. J. Hofland, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **2003**, 88, 270-276.

¹⁹ a) C. Fiocchi, *Gastroenterology*, **1998**, 115, 182-205; b) S.B. Hanauer, D. H. Present, *Rev. Gastroenterol. Disord.*, **2003**, 3, 81-92.

²⁰ E. González-Rey, N. Varela, A. F. Sheibanie, A. Chorny, D. Ganea, M. Delgado, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2006**, 103, 4228-4233.

modelo de EC inducida por haptenos, usando ácido 2,4,6-trinitrobencensulfónico (TNBS) como inductor de un cuadro clínico en ratas similar al humano en EC, a efectos clínicos, histopatológicos e inmunológicos. Los resultados obtenidos demuestran que la CST inhibe la producción *in vitro* de mediadores de inflamación en macrófagos activados, protege frente al desarrollo de colitis inducida por TNBS *in vivo*, y reduce la respuesta inflamatoria sistémica e intestinal *in vivo* en ratones con colitis inducida por TNBS. Globalmente, estas acciones se verían explicadas con la regulación de citoquinas mediada por CST, disminuyendo la liberación de citoquinas proinflamatorias y citotóxicas como TNF α , IFN γ , IL-2, IL-6 u NO, al mismo tiempo que estimula la producción y secreción de IL-10, de carácter antiinflamatorio.²⁰

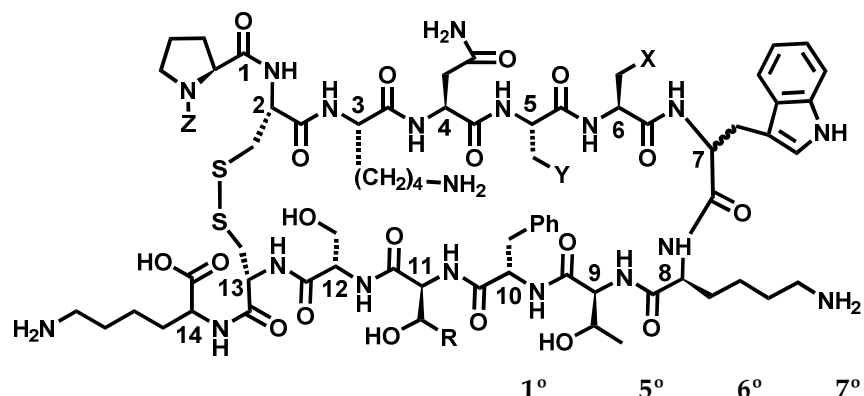
Con toda esta información disponible sobre CST, y usando los conocimientos en la manipulación y modificación de SST de trabajos previos en nuestro grupo, la empresa BCN Peptides S.A. sintetizó una serie de análogos de SST14 y rCST14 para probar su eficacia frente a modelos de respuesta inmune e inflamatoria *in vitro*, y de EC y de artritis inducida por colágeno *in vivo*. Los resultados, que se comentarán más adelante, fueron muy prometedores. En consecuencia, propusieron a nuestro grupo de investigación un estudio conformacional de dichos análogos en aras de entender la relación estructura-actividad para cada uno de sus análogos.

7.2. Síntesis de análogos de cortistatina.

La estrategia de síntesis de nuevos derivados de rCST14 **22-26** fue hecha siguiendo la misma filosofía que los análogos de SST14 previamente descritos (tabla 7.1). De nuevo, se incluyó la sustitución de L-Trp7 por D-Trp⁷²¹ en vista de aumentar la semivida plasmática de los nuevos péptidos mientras se

²¹ Hay que considerar que la numeración de CST14 difiere a la de SST14, dado que la primera sólo tiene un residuo extracíclico por su extremo N-terminal y la segunda cuenta con dos. Así, el D-Trp7 de la rCST14 corresponde al D-Trp8 de la SST14.

mantiene la actividad, a la par que aumenta la interacción con la L-Lys8 contigua.²²



	1°	5°	6°	7°	11°
rCST14 (21)	Pro	Phe	Phe	Trp	Ser
[L-Msa6_D-Trp7_L-Thr11]-CST14 (22)	Pro	Phe	Msa	D-Trp	Thr
octanoil-[L-Msa6_D-Trp7_L-Thr11]-CST14 (23)	N-oct-Pro	Phe	Msa	D-Trp	Thr
[L-Msa5_D-Trp7_L-Thr11]-CST14 (24)	Pro	Msa	Phe	D-Trp	Thr
octanoil-[L-Msa5_D-Trp7_L-Thr11]-CST14 (25)	N-oct-Pro	Msa	Phe	D-Trp	Thr
octanoil-[L-Msa5_D-Trp7_L-Thr11]-CST13 (26)	N-oct-Pro	Msa	Phe	D-Trp	Thr

Tabla 7.1. Derivados de cortistatina presentados en este capítulo.

Además, para aumentar la estabilidad y la rigidez conformacional se introdujo L-mesitilalanina (Msa) en sustitución de uno de los anillos de Phe, provocando un aumento de las interacciones π - π de la molécula. Como ya se ha indicado con anterioridad, la Msa es elegida debido a que la presencia de los tres metilos causa un incremento en la densidad electrónica del anillo aromático, aparte de aumentar el impedimento estérico y la rigidez del anillo.²³ En función de la Phe nativa elegida para ser sustituida, hemos comprobado que en SST14 se puede producir una restricción conformacional hacia una posición u otra, dando un perfil farmacológico distinto.²⁴ Otro cambio realizado sobre el

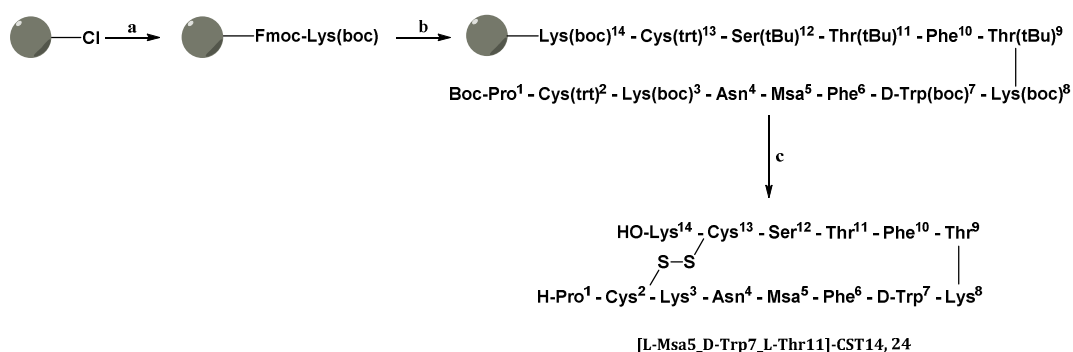
²² a) G. Garcia-Tsao, A. J. Sanyal, N. D. Grace, W. Carey, *Hepatology*, **2007**, 46, 922-938; b) D. F. Veber, F. W. Holly, W. J. Paleveda, R. F. Nutt, S. J. Bergstrand, M. Torchiana, M. S. Glitzer, R. Saperstein, R. Hirschmann, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1978**, 75, 2636-2640; c) J. Rivier, M. Brown, W. Vale, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1975**, 65, 746-751; d) B. H. Arison, R. Hirschmann, D. F. Veber, *Bioorg. Chem.*, **1978**, 7, 447-451; e) O. Ovadia, S. Greenberg, B. Laufer, C. Gilon, A. Hoffman, H. Kessler, *Expert Opin. Drug Discovery*, **2010**, 5, 655-671.

²³ E. Medina, A. Moyano, M. A. Pericas, A. Riera, *Helv. Chim. Acta*, **2000**, 83, 972.

²⁴ P. Martín-Gago, M. Gómez-Caminals, R. Ramón, X. Verdaguer, P. Martín- Malpartida, E. Aragón, J. Fernández-Carneado, B. Ponsati, P. López-Ruiz, M. Alicia Cortés, B. Colás, M. J. Macías, A. Riera, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2012**, 51, 1820-1825. Ver también la sección dedicada en el Capítulo II de antecedentes.

esqueleto base de rCST14 fue la sustitución de la L-Ser11 por L-Thr11, haciendo unos derivados peptídicos más afines intracíclicamente a los de SST14. En anteriores derivados, el metilo terminal que proporciona la L-Thr11 demuestra dar una información estructural muy importante, debido a sus interacciones NOE de larga distancia con protones de otros aminoácidos. Para los análogos sintetizados, se diseñaron sendos homólogos con un resto octanoílo unido al N-terminal, para comprobar si un cambio de polaridad, haciendo los péptidos más lipófilos, causarían un cambio de actividad importante. Por último, se decidió estudiar el producto de degradación de **25**, el péptido **26**, que sería el resultado de la previsible acción de las proteasas sobre la L-Lys14 C-terminal.

En el trabajo de Criado *et al*^{4b} se realizó un estudio de cómo la eliminación de la L-Pro1 causaba la pérdida de todas las actividades biológicas únicas para rCST14 descritas hasta la fecha; también, que si el aminoácido eliminado era la L-Lys14, la capacidad de CST13 de modificar las fases del sueño se perdía, aunque seguía produciéndose un descenso de la actividad cortical con hipomovilidad. Si recordamos el trabajo de Mario Delgado,²⁰ la SST14 es incapaz de actuar como inmunomoduladora donde CST14 sí puede. Por ello, estos dos aminoácidos terminales extracíclicos se mantienen en los derivados sintetizados, para garantizar que dicha parte de la molécula no fuese impedimento para actuar en los ensayos biológicos inmunitarios planteados.



Esquema 7.1. Ejemplo de síntesis, péptido **24**. a) 1. Fmoc-L-Lys(boc)-OH (3 eq) ó Fmoc-L-Cys(trt)-OH (3 eq), DIEA (3 eq), 2. MeOH; b) 1. Piperidina 20% DMF, 2. Fmoc-Aaa-OH (1.5-3 eq), DIPCIDI (3 eq), HOBt (3 eq), DMF (x12), 3. Piperidina 20% DMF, 4. Boc-Pro-OH o Fmoc-Pro-OH, DIPCIDI, HOBt, DMF; c) 1. CH₂Cl₂/TFE/AcOH, 2. I₂, 3. TFA/CH₂Cl₂/anisol/H₂O.

La Fmoc-L-Msa-OH se obtuvo usando el procedimiento previamente descrito en nuestro grupo.^{24,25} Todos los péptidos expuestos en este capítulo se sintetizaron en fase sólida, usando la estrategia Fmoc/^tBu en resina 2-clorotritil cloruro (esquema 7.1).²⁶

7.3. Ensayos biológicos.

Se llevaron a cabo ensayos biológicos de tipo *in vivo* e *in vitro*. Estos ensayos biológicos fueron realizados por el grupo de investigación del Dr. Mario Delgado.²⁷ Aunque no participamos en su elaboración, se incluyen en esta sección para visualizar los resultados que se obtuvieron al probar la capacidad inmunorreguladora de estos nuevos péptidos híbridos.

Se definieron dos tipos de ensayo para las pruebas *in vitro*, respuesta inmune *in vitro* frente a esplenocitos de machos de ratón C57Bl/6²⁸ y respuesta inflamatoria *in vitro* mediante el uso de la línea celular RAW 264.²⁹ Para realizar los primeros ensayos de respuesta inmune los esplenocitos fueron aislados, y las células no adherentes (formadas por un 80% de células T) se incubaron en presencia de anticuerpo anti-CD3 y de péptido a medir, esto es SST14 control, rCST14 (**21**) y péptidos **22-25**. La detección de las citoquinas IFN γ e IL-2 se realizó mediante ELISA. El grado de proliferación se midió a través del cultivo durante 72 horas en presencia de [³H]-timidina (0,5 μ Ci ó 0,0185 MBq) por pocillo, midiendo posteriormente la radiación en membranas aisladas mediante recuento por centelleo. En cuanto a los ensayos destinados a medir la respuesta inflamatoria, se incubaron durante 24 horas en paralelo dichas células en

²⁵ R. Ramón, M. Alonso, A. Riera, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2007**, *18*, 2797 – 2802.

²⁶ G. B. Fields, R. L. Noble, *Int. J. Protein Res.*, **1990**, *35*, 161-214.

²⁷ Dr. Mario Delgado Mora, grupo *Neuroinmunología de enfermedades inflamatorias y autoinmunes*, Instituto de Parasitología y Biomedicina López – Neyra, Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

²⁸ P. Kisielow, H. Blüthmann, U. D. Staerz, M. Steinmetz, H. von Boehmer, *Nature*, **1988**, *333*, 742-746.

²⁹ a) P. Ralph, I. Nakoinz, *J. Immunol.*, **1977**, *119*, 950-954; b) W. C. Raschke, S. Baird, P. Ralph, I. Nakoinz, *Cell*, **1978**, *15*, 261-267; c) L. C. Denlinger, P. L. Fissette, K. A. Garis, G. Kwon, A. Vázquez-Torres, A. D. Simon, B. Nguyen, R. A. Proctor, P. J. Bertics, J. A. Corbett, *J. Biol. Chem.*, **1996**, *271*, 337-342.

presencia o ausencia de lipopolisacárido (LPS) de *Escherichia coli* (con presencia de LPS como valores máximos de inflamación activa, en ausencia como parámetro basal). A su vez, a parte de las células crecidas en presencia de LPS se les añadió SST14 control, **21** y los derivados **22-25**, para medir su respuesta. La detección de las citoquinas TNF α e IL-6 fue determinada mediante ELISA, mientras que la cantidad de NO liberado fue medido gracias al test de Griess.

Sobre los péptidos analizados, destacó notablemente que el único con una actividad similar a rCST14 (**21**) fuera el análogo **25** (tabla 7.2). Los niveles de respuesta de ambos es pareja, lo que se traduce en una reducción de los niveles de proliferación y citoquinas muy por debajo del nivel máximo de activación celular. Así, tanto SST14 como los análogos **22**, **23** y **24** serían incapaces de dar una respuesta *in vitro*. Mientras que para lo anteriormente estudiado de SST14 estos resultados no resultan sorprendentes, llama la atención la disparidad de respuesta entre los análogos **24** y **25**, que únicamente difieren en su estructura por un resto octanoílo.

	Anti-inmune			Anti-inflamatorio		
	Proliferación	INF γ (ng/ml)	IL-2 (ng/ml)	TNF α (ng/ml)	IL-6 (ng/ml)	NO (ng/ml)
basal	640	0,00	0,23	0,48	0,00	0,44
activado	9843	2,52	3,22	5,78	4,48	5,23
rCST14 (21)	5500	1,13	1,52	3,17	3,78	3,08
SST14	9936	2,31	3,14	5,21	4,20	4,32
[L-Msa6_D-Trp7_L-Thr11]-CST14 (22)	9866	2,52	3,22	4,90	4,23	4,43
octanoil-[L-Msa6_D-Trp7_L-Thr11]-CST14 (23)	9316	2,53	3,22	3,84	3,83	4,49
[L-Msa5_D-Trp7_L-Thr11]-CST14 (24)	10090	2,56	3,23	4,04	3,79	4,36
octanoil-[L-Msa5_D-Trp7_L-Thr11]-CST14 (25)	5863	1,33	1,80	2,51	2,77	3,04

Tabla 7.2. Niveles de proliferación y citoquinas en los ensayos *in vitro* realizados.

Yendo un paso más allá, el análogo **25** y su producto de degradación, el péptido de trece residuos **26**, fueron probados en modelos *in vivo* animales para medir su respuesta frente a artritis inducida por colágeno y enfermedad de

Crohn (cuyos resultados se muestran reflejados en la tabla 7.3), utilizando métodos ya descritos en la bibliografía por el Dr. Mario Delgado.^{20,30}

Se procedió a medir los efectos de ambos análogos en artritis inducida por colágeno en modelos murinos. Así, se crearon tres grupos control de ratones, uno mediante administración de solución salina (valores basales), otro administrando colágeno tipo II en adyuvante completo de Freund y *Mycobacterium tuberculosis* (valores máximos activados), y un último grupo control con la coadministración del inductor de artritis y la incorporación del anticuerpo antiTNF α , como modelo de respuesta positiva a tratamiento. A la segunda población se le administró diariamente entre los días 25 y 29 o bien solución salina o bien los compuestos **25** o **26**. Con el objeto de determinar el grado de artritis producida, se determinó el daño producido en una escala del 0 al 10, así como la anchura de la pata tras 50 días de ensayo.

Para estudiar los efectos de **25** sobre EC, se indujo la inflamación de colon en ratones mediante la administración intrarrectal de TNBS, creando un cuadro clínico similar al que se produce con EC en humanos. Se usaron tres poblaciones de ratones: una primera población control de valores basales a la cual únicamente se administró una solución salina con 50% de etanol, la segunda mediante la introducción de TNBS en 50% de etanol, y la tercera a la que se indujo la inflamación colónica y se le administró anticuerpo antiTNF α , como modelo de respuesta positiva a tratamiento. Una vez más, a parte de la segunda población se le administró el análogo **25** en días puntuales (3, 4 y 5 tras establecerse la enfermedad) para comprobar su respuesta al tratamiento. Se determinó el grado de daño provocado y prevención obtenida, midiendo el nivel de diarrea (como medida indirecta del grado de colitis) del 0 al 4, daño macroscópico en intestino grueso tras necropsia el décimo día de estudio en valores del 0 al 10, y la masa de los ratones al final del estudio.

³⁰ a) E. González-Rey, A. Chorny, G. Robledo, M. Delgado, *J. Exp. Med.*, **2006**, *203*, 563-571; b) E. Gonzalez-Rey, A. Chorny, R. G. del Moral, N. Varela, M. Delgado, *Ann. Rheum. Dis.*, **2007**, *66*, 582-588; c) WO2007/082980A1.

	Artritis inducida por colágeno		Enfermedad de Crohn		
	Artritis clínica grado (0-10)	Hinchazón de pata (mm)	Puntuación de grado de colitis (0-4)	Puntuación macroscóp. (0-10)	Masa corporal (g)
basal	0,0	2,08	0,30	0,2	25
activado	8,4	2,84	3,60	7,5	17
antiTNF α	4,9	2,49	2,10	2,5	19
octanoil-[L-Msa5_D-Trp7_L-Thr11]-CST14 (25)	2,9	2,33	1,38	1,9	21
octanoil-[L-Msa5_D-Trp7_L-Thr11]-CST13 (26)	4,7	2,52	n.d.	n.d.	n.d.

Tabla 7.3. Niveles de parámetros para los ensayos *in vivo* realizados.

De nuevo, el derivado **25** demostró un buen nivel de actividad frente a ambos ensayos *in vivo*, llegando a superar en efectividad al obtenido mediante anticuerpo antiTNF α . Aunque la eficacia de **26** disminuye notablemente frente a la prevención del desarrollo de artritis, los valores obtenidos entran en el espectro obtenido con el uso del anticuerpo. Estos datos podrían abrir una nueva ventana terapéutica en el tratamiento de dichas enfermedades de carácter inflamatorio, más allá del uso propuesto, hasta ahora, de rCST14.

7.4. Estructura.

Tanto rCST14 **21** como sus análogos sintéticos **22-26** fueron analizados por RMN. Se procedió a realizar los experimentos bidimensional mononuclear TOCSY y NOESY, como con la SST14 y sus derivados.^{24,31} Aquellos espectros bidimensionales con un nivel de señal suficiente permitieron caracterizar su conformación mayoritaria en solución (H₂O/D₂O 9:1 pH 6'5 en tampón fosfato 100 mM, 285 K) utilizando el programa de cálculo CNS³² mediante la interfaz StrutCalc,³³ lanzando cálculos de 180 estructuras cada uno (ver sección 3.4).

³¹ K. Wuethrich, G. Wider, G. Wagner, W. Braun, *J. Mol. Biol.*, **1982**, 155, 311-319.

³² A. T. Brunger, P. D. Adams, G. M. Clore, W. L. DeLano, P. Gros, R. W. Grosse-Kunstleve, J. S. Jiang, J. Kuszewski, M. Nilges, N. S. Pannu, R. J. Read, L. M. Rice, T. Simonson, G. L. Warren *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **1998**, 54, 905-921.

³³ P. Martín-Malpartida, M. J. Macías, datos sin publicar.

7.4.1. rCST14 (21).

Los únicos estudios de este tipo llevados a cabo sobre CST14 permitieron obtener únicamente señales NOEs secuenciales, debido a la alta flexibilidad conformacional incluso a baja temperatura,^{4b} al igual que ocurre con la SST14 nativa.³⁴ Aunque en esta ocasión, bajo condiciones experimentales similares, tampoco fuimos capaces de determinar una conformación mayoritaria para **21** (figura 7.2), hemos comprobado la existencia de NOEs a media distancia entre los aminoácidos L-Trp7 y L-Lys8.

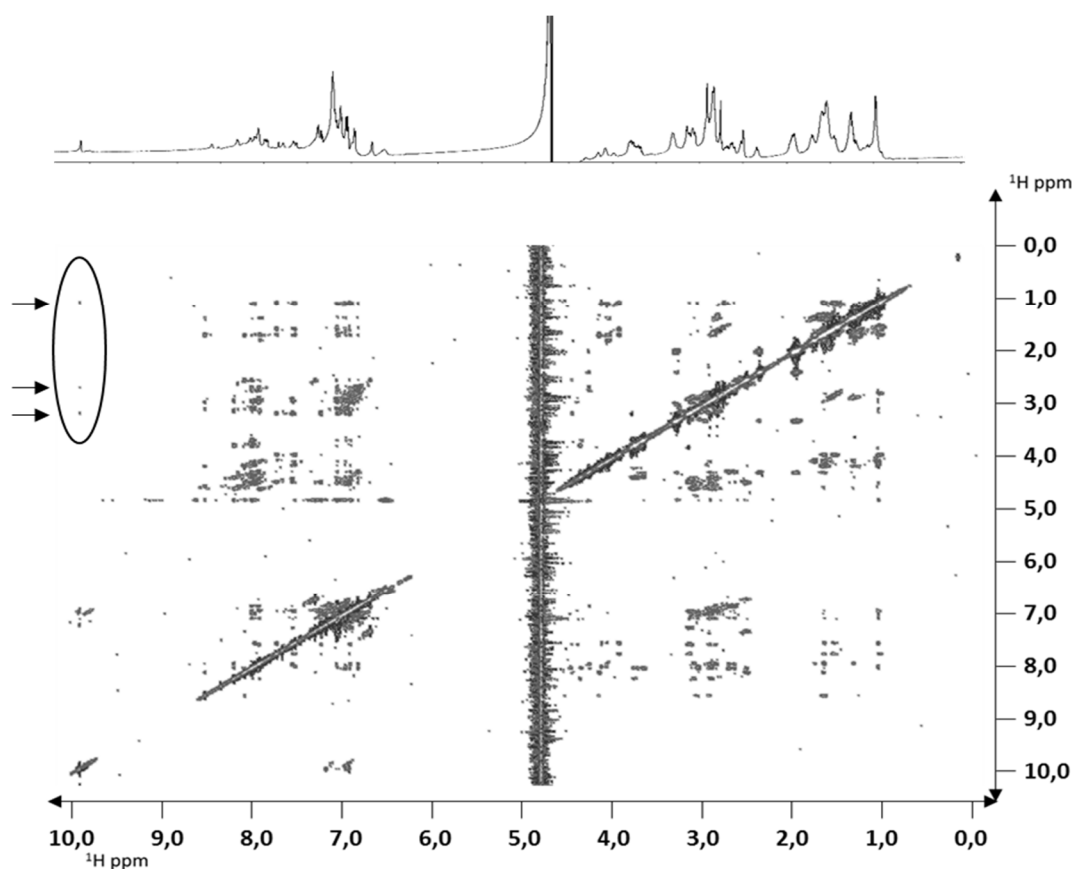


Figura 7.2. Espectros mono y bidimensionales de rCST14 (**21**). En la zona rodeada, se observan las señales NOE entre H ϵ 1 de L-Trp7 con su H β y los H γ y H ϵ de L-Lys8.

Esto indica que a pesar de la flexibilidad que la rCST14 presenta, se da la formación del giro β , bien mediante una interacción tipo fuerzas de van der

³⁴ a) M. Knappenberg, A. Michel, A. Scarso, J. Brison, J. Zanen, K. Hallenga, P. Deschrijver, G. Van Binst, *Biochim. Biophys. Acta Protein Struct. Mol. Enzymol.*, **1982**, 700, 229-246; b) K. Hallenga, G. Van Binst, A. Scarso, A. Michel, M. Knappenberg, C. Dremier, J. Brison, J. Dirckx, *FEBS Lett.*, **1980**, 119, 47-52; c) L. A. Buffington, V. Garsky, J. Rivier, W. A. Gibbons, *Biophys. J.*, **1983**, 41, 299-304; d) L. A. Buffington, V. Garsky, J. Rivier, W. A. Gibbons, *Int. J. Pept. Protein Res.*, **1983**, 21, 231-241.

Waals entre la cadena alifática y los anillos aromáticos, bien una interacción iónica entre el grupo amonio terminal y la nube π electrónica, o una mezcla de ambos fenómenos, como fue descrito por Freidinger *et al.*³⁵ Como en SST14, dicha flexibilidad ha de ser la causa de su versatilidad funcional,³⁶ de ahí el perfil farmacológico de unión con los SSTR similar.

Sin embargo, para los derivados estudiados **22-25** sí fue posible determinar una única conformación mayoritaria, dado que los espectros bidimensionales mostraban un número de señales mucho mayor que rCST14.

7.4.2. [L-Msa6_D-Trp7_L-Thr11]-CST14 (**22**).

El péptido [L-Msa6_D-Trp7_L-Thr11]-CST14 (**22**) presenta una estructura bien definida (figura 7.3),³⁷ de características muy similares a su análogo somatostatínico [L-Msa7_D-Trp8]-SST14 (figura 2.11).²⁴

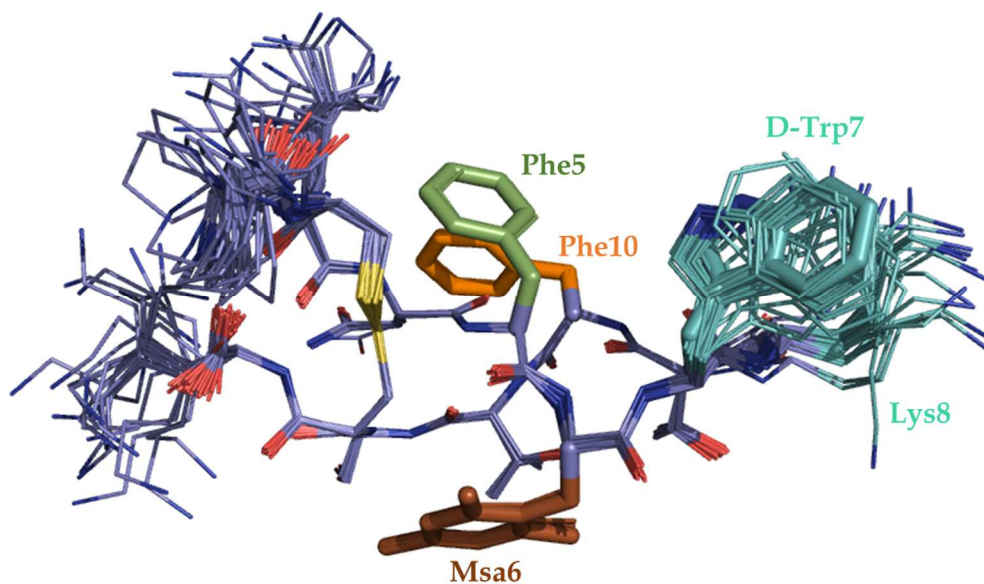


Figura 7.3. Superposición de las estructuras de menor energía de [L-Msa6_D-Trp7_L-Thr11]-CST14 (**22**) según los datos experimentales de RMN.

³⁵ R. M. Freidinger, D. S. Perlow, W. C. Randall, R. Saperstein, B. H. Arison, D. F. Veber, *Int. J. Pept. Protein Res.*, **1984**, 23, 142-150.

³⁶ G. V. Nikiforovich, G. R. Marshall, S. Achilefu, *Chem. Biol. Drug Des.* **2007**, 69, 163-169.

³⁷ Principales señales NOE que satisfacen esta estructura: a) **H ϕ de Msa6** con H δ 21 y H δ 22 de Asn4. b) **H η de Msa6** con H δ 21 y H δ 22 de Asn4. c) **H ϵ de Msa6** con H β 2, H β 3 de Asn4; H α y H γ de Thr9; H β y H γ de Thr11. d) **H δ de Phe5** con H ϵ y H ζ de Phe10. e) **H δ de Phe10** con H β 2 y H β 3 de Phe5.

Señales NOE que no satisfacen esta estructura que aparecen en el espectro bidimensional: a) **H ϕ de Msa6** con H ϵ de Phe5; H δ y H ϵ de Phe10.

El péptido se orienta de forma que Phe5 y Phe10 quedan enfrentados en una geometría *edge-to-face*, quedando el aminoácido 5 por encima de 10, mientras que Msa6 queda posicionado en la cara contraria del péptido. La fuerte interacción entre D-Trp7 y Lys8 crea una potente asociación entre ambos residuos, al mismo tiempo que presentan una ausencia de señales NOE con el resto de aminoácidos, queda reflejada en su disposición apartada al resto de la molécula.

7.4.3. octanoil-[L-Msa6_D-Trp7_L-Thr11]-CST14 (23).

El derivado octanoil-[L-Msa6_D-Trp7_L-Thr11]-CST14 (23), a diferencia de 22, presenta una interacción entre Phe5 y Phe 10 *offset-stacked*, aunque mantiene la Msa6 en el lado contrario de la molécula (figura 7.4).³⁸

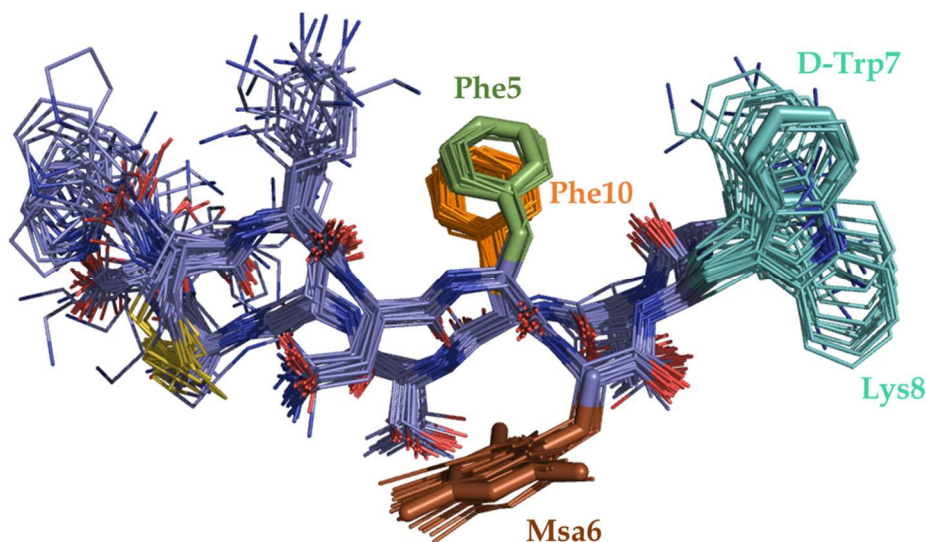


Figura 7.4. Superposición de las estructuras de menor energía de octanoil-[L-Msa6_D-Trp7_L-Thr11]-CST14 (23) según los datos experimentales de RMN (no representado el resto octanoílo).

En este caso, comparando con su equivalente 22, la estructura se presenta más relajada, alejando el puente disulfuro del β -giro. Cabe señalar que D-Trp7 y Lys8 se alejan del resto de la molécula, con dos disposiciones diferentes, pero divergentes y equivalentes desde el mismo punto, una en el que el indol se

³⁸ Principales señales NOE que satisfacen esta estructura: a) **H α de Msa6** con H δ 21 y H δ 22 de Asn4. b) **H η de Msa6** con H δ 21 y H δ 22 de Asn4. c) **H ϵ de Msa6** con H β 2 y H δ 21 de Asn4; H γ de Thr9; H γ de Thr11. d) **H δ de Phe5** con H β 2 y H β 3 de Phe10. e) **H δ de Phe10** con H β 2 y H β 3 de Phe5.

Señales NOE que no satisfacen esta estructura: a) **H α de Msa6** con H δ de Phe5; H δ de Phe10.

orienta hacia el lado de Phe5-10 y la otra hacia Msa6. No se detectaron interacciones NOE entre el resto octanoilo y el resto del péptido.

7.4.4. [L-Msa5_D-Trp7_L-Thr11]-CST14 (**24**).

La estructura definida por los datos espectroscópicos de [L-Msa5_D-Trp7_L-Thr11]-CST14 (**24**) lleva a un sistema (figura 7.5)³⁹ que presenta una interacción entre los anillos 5-10 con una geometría *edge-to-face*, con una peculiaridad, vista anteriormente en el análogo [L-Dfp11_L-Msa7_D-Trp8]-SST (**5**) (figura 3.15): el par aromático queda orientado de manera inversa a la que resulta habitual, afectando de igual manera al residuo de Phe6. A efectos visuales, se ha orientado la figura de una forma similar a lo visto anteriormente, pero en la figura 7.6 se puede comprobar cómo los péptidos **5** y **24** presentan una orientación similar. Difiere de lo que se esperaba de esta estructura, ya que preveíamos un sistema tipo clúster como el visto en [L-Msa6_D-Trp8]-SST14 (figura 2.10),²⁴ pero los espectros NOESY obtenidos dan a entender que no existe ninguna interacción del anillo Phe6 con los otros dos.

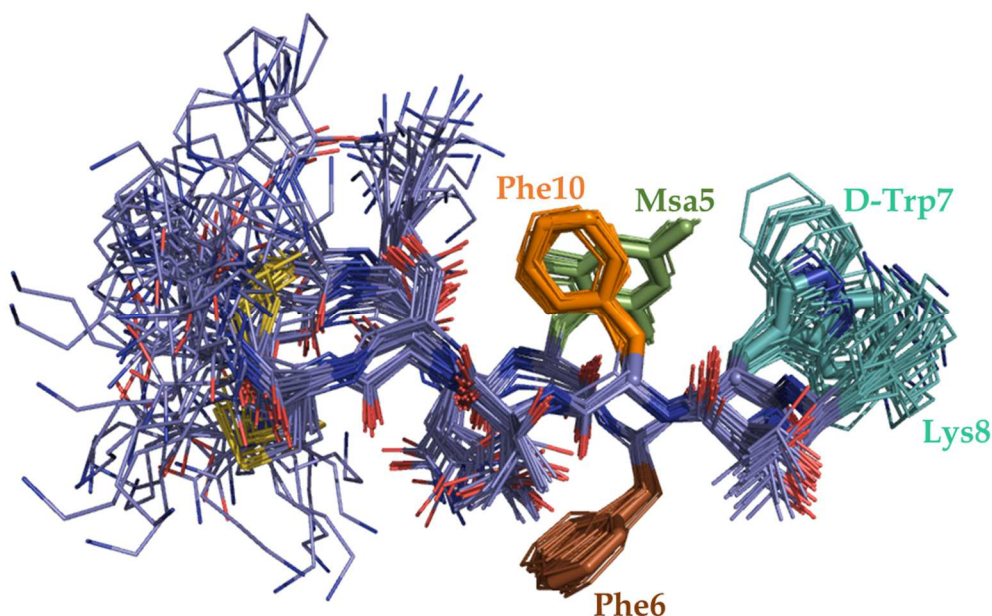


Figura 7.5. Superposición de las estructuras de menor energía de [L-Msa5_D-Trp7_L-Thr11]-CST14 (**24**) según los datos experimentales de RMN.

³⁹ Principales señales NOE que satisfacen esta estructura: a) **H δ de Phe6** con H γ de Thr9; H γ de Thr11. b) **H β 3 de Phe6** con H δ 21 y H δ 22 de Asn4. c) **H ϵ de Msa5** con H β 2 y H δ de Phe10. d) **H ϕ de Msa5** con H δ , H ϵ y H ζ de Phe10. e) **H η de Msa5** con H δ y H ϵ de Phe10.

Señales NOE que no satisfacen esta estructura: a) **H β 2 de Msa5** con H δ de Phe10.

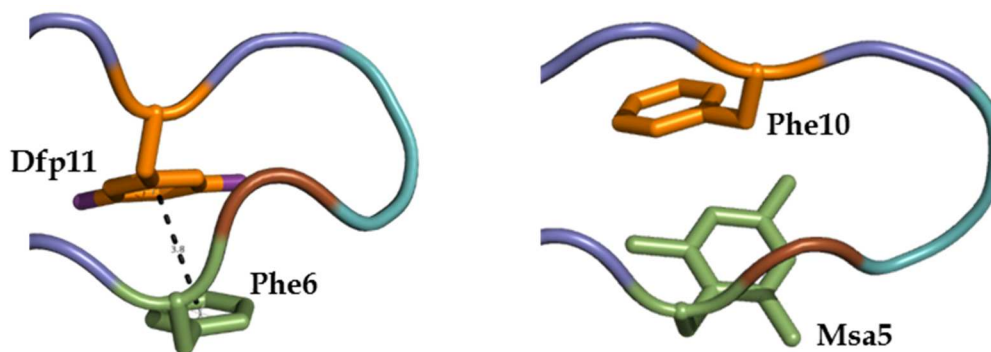


Figura 7.6. Comparación de la interacción Phe6-Dfp11 en [L-Dfp11_L-Msa7_D-Trp8]-SST (**5**) (izquierda) y Msa5-Phe10 en [L-Msa5_D-Trp7_L-Thr11]-CST14 (**24**) (derecha), invertidos respecto a la orientación par aromática habitual.

7.4.5. octanoil-[L-Msa5_D-Trp7_L-Thr11]-CST14 (**25**).

Satisfactoriamente, la diferencia llegó cuando se definió la estructura del análogo octanoil-[L-Msa5_D-Trp7_L-Thr11]-CST14 (**25**) (figura 7.7).⁴⁰

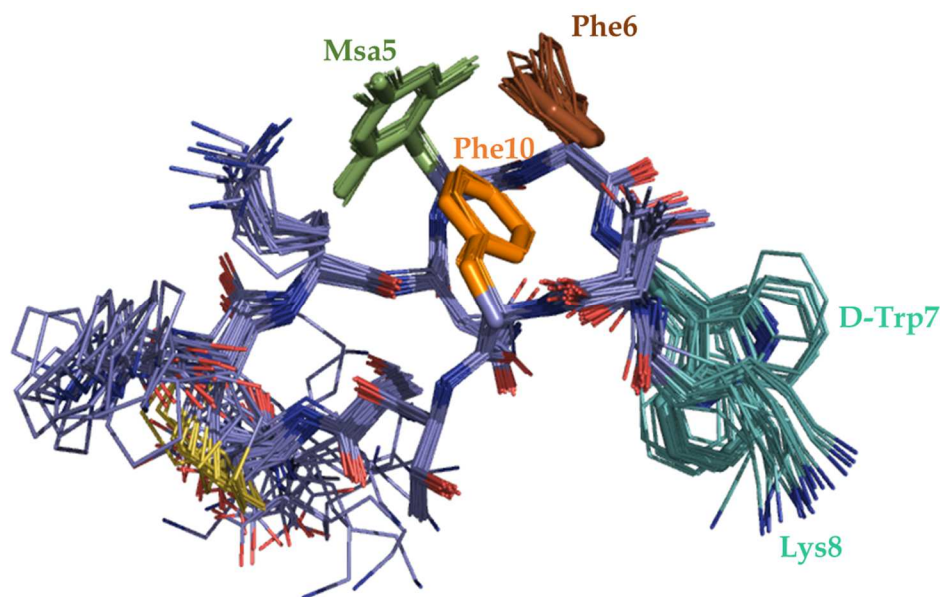


Figura 7.7. Superposición de las estructuras de menor energía de octanoil-[L-Msa5_D-Trp7_L-Thr11]-CST14 (**25**) según los datos experimentales de RMN (no representado el resto octanoílo).

Mientras que la región D-Trp7Lys8 se mantiene unida entre sí y apartada del resto de la molécula, formando el β -giro, los tres residuos aromáticos se

⁴⁰ Principales señales NOE que satisfacen esta estructura: a) **H ϕ de Msa5** con H δ y H ϵ de Phe6; H δ y H ϵ de Phe10. b) **H η de Msa5** con H δ y H ϵ de Phe6; H δ y H ϵ de Phe10. c) **H δ de Phe10** con H ϵ y H ζ de Phe6
Señales NOE que no satisfacen esta estructura: a) **H δ 1 de D-Trp7** con H ϕ y H η de Msa5. b) **H β de Thr10** con H δ de Phe6; H ϵ de Phe10.

unen formando un clúster, donde Msa5 y Phe10 se definen con un acercamiento de tipo *edge-to-face*, y Phe6 se acerca al décimo residuo de manera *offset-stacked*, con fuertes interacciones NOE entre los tres anillos; apuntan al lado contrario de D-Trp7Lys8. Es, por tanto, el único análogo que difiere estructuralmente del resto. En este caso sí cumple lo esperado por su equivalencia con [L-Msa6_D-Trp8]-SST14.²⁴ El hecho de que este péptido forme un clúster que **24** no presenta puede que sea debido a algún tipo de interacción extra dada por el residuo octanoilo, no detectable mediante RMN por la ausencia de NOEs de dicha cadena con el resto de la estructura.

7.4.6. octanoil-[L-Msa5_D-Trp7_L-Thr11]-CST13 (**26**).

Con la vista puesta en la estabilidad del péptido **25** en suero (semivida de 38 minutos), se sintetizó el producto de su metabolismo directo por proteasas, el derivado octanoil-[L-Msa5_D-Trp7_L-Thr11]-CST13 (**26**), cuya semivida en sensiblemente mayor (35 horas).⁴¹ Sin embargo, la pérdida de L-Lys14 supuso un decrecimiento importante de la solubilidad de la muestra, siendo imposible obtener una concentración suficiente para llevar a cabo los experimentos de RMN bidimensionales, que fuesen equivalentes y por tanto comparables al resto de péptidos estudiados. Para trabajos futuros, hemos planteado la posibilidad de incluir en la estructura del análogo **25** una D-Lys14 N-terminal, que aumentaría el tiempo de vida medio plasmático del análogo resultante, sin que tuviese que afectar a la estructura tridimensional resultante.

A la luz de estos resultados, se comprueba que mientras **22-24** presentan estructuras similares, el espacio tridimensional ocupado por **25** sobresale por la formación de un clúster aromático. Además, **25** es el único de los derivados estudiados en los ensayos biológicos que demuestra una actividad importante en los ensayos tanto *in vitro*, comparando su acción frente a rCST14, como *in vivo*, comparándolo con el control positivo dado por antiTNF α .

⁴¹ Ambos ensayos de tiempo de vida medio plasmático fueron llevados a cabo por la empresa BCN Peptides S.A., incubando a tiempos variables cada péptido en suero humano.

7.5. El uso de [L-Dfp7_D-Trp8]-SST14 (2).

Como ya hemos visto en el capítulo III de la presente tesis, el análogo de somatostatina [L-Dfp7_D-Trp8]-SST14 (2) presenta en disolución una estructura tipo clúster (figura 3.11). Además del hecho de que sea un clúster aromático, las distancias relativas entre los residuos pertenecientes al trío y la distancia hasta el par D-Trp8Lys9 son equivalentes al análogo octanoil-[L-Msa5_D-Trp7_L-Thr11]-CST14 (25) (comparación en la figura 7.8). En este sentido, difiere sutilmente de [L-Msa6_D-Trp8]-SST14, donde la orientación del dúo D-Trp8Lys9 tiende hacia el mismo sentido que el clúster, mientras que en 2 y 25 van en sentidos opuestos.

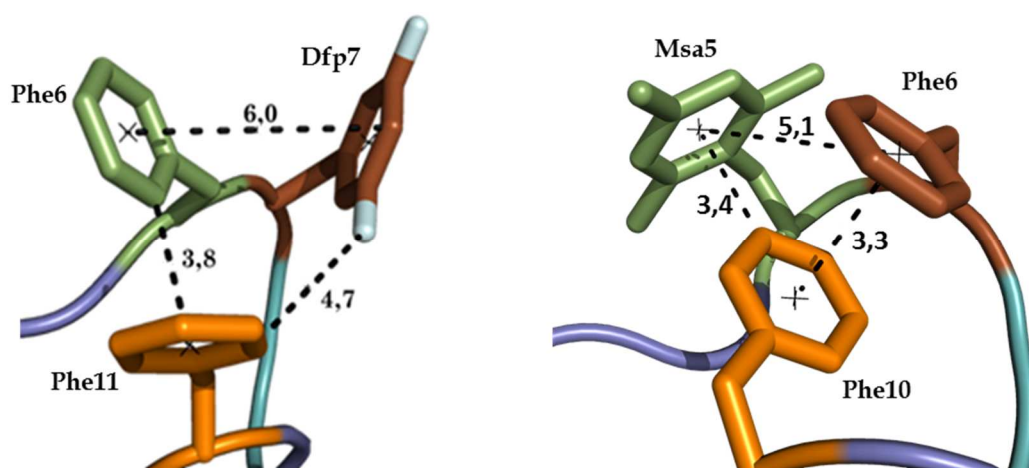


Figura 7.8. Comparación de los clúster formados entre [L-Dfp7_D-Trp8]-SST (2) (izquierda) y octanoil-[L-Msa5_D-Trp7_L-Thr11]-CST14 (25) (derecha). Distancias expresadas en Ångström (Å).

Por ello, se decidió hacer los mismos ensayos biológicos con 2 que los aplicados a estos derivados de CST14.²⁷ Como ya definió en su trabajo Mario Delgado,²⁰ adicionalmente de lo ensayado posteriormente, la SST14 es incapaz de dar una respuesta inmunorreguladora. Pero de los péptidos 22-25 estudiados, todos ellos derivados de rCST14 (21), 25 es el único que presenta dicha actividad, aparte de ser el único que cuenta con un clúster aromático. Propusimos que dicha actividad biológica podría estar relacionada de forma no estructural sino conformacional: si la restricción impulsada en los derivados 22, 23 y 24 impide una acción inmunorreguladora en los ensayos realizados, mientras que la restricción de 25 lo permite, un péptido de esta familia (sea

derivado de rCST14 o de SST14) con un ordenamiento parecido podría tener una actividad biológica similar.

El análogo **2** fue sometido a los mismos ensayos biológicos *in vivo* e *in vitro* que fueron aplicados a **25**, emulando las mismas condiciones. Los resultados de dichas pruebas se pueden observar en las tablas 7.4 (nivel de proliferación y citoquinas) y 7.5 (artritis inducida por colágeno y enfermedad de Crohn), mostradas a continuación, en donde **2** demostró tener un perfil de actividad similar al de **25**.

	Anti-inmune			Anti-inflamatorio		
	Proliferación	INF γ (ng/ml)	IL-2 (ng/ml)	TNF α (ng/ml)	IL-6 (ng/ml)	NO (ng/ml)
basal	640	0,00	0,23	0,48	0,00	0,44
activado	9843	2,52	3,22	5,78	4,48	5,23
rCST14 (21)	5500	1,13	1,52	3,17	3,78	3,08
SST14	9936	2,31	3,14	5,21	4,20	4,32
octanoil-[L-Msa5_D-Trp7_L-Thr11]-CST14 (25)	5863	1,33	1,80	2,51	2,77	3,04
[L-Dfp7_D-Trp8]-SST14 (2)	5596	1,11	1,32	2,96	3,79	3,35

Tabla 7.4. Niveles de proliferación y citoquinas para **21** y **2** en los ensayos *in vitro* realizados.

	Artritis inducida por colágeno		Enfermedad de Crohn		
	Artritis clínica grado (0-10)	Hinchazón de pata (mm)	Puntuación de grado de colitis (0-4)	Puntuación macroscóp. (0-10)	Masa corporal (g)
basal	0	2,08	0,30	0,2	25
activado	8,4	2,84	3,60	7,5	17
antiTNF α	4,9	2,49	2,10	2,5	19
octanoil-[L-Msa5_D-Trp7_L-Thr11]-CST14 (25)	2,9	2,33	1,38	1,9	21
[L-Dfp7_D-Trp8]-SST14 (2)	3,7	2,45	2,13	2,8	19

Tabla 7.5. Niveles de parámetros frente a enfermedades reproducidas *in vivo* para **25** y **2** en los ensayos *in vivo* realizados.

Estos resultados muestran que un derivado de SST con una conformación tridimensional restringida es capaz de tener un perfil terapéutico cuya secuencia nativa es incapaz de realizar. Descarta, además, que para este perfil biológico o lo que es lo mismo para actuar sobre la inmunorregulación la presencia de los aminoácidos Pro N-terminal y Lys C-terminal sea necesaria.

Posteriormente, se estableció fue una comparación del perfil farmacológico frente a los SSTR1-5 para los análogos **2** y **22-25**, comparándolos a su vez con rCST14 (**21**) y SST14 (tabla 7.6).⁴²

	SSTR1 (nM)	SSTR2 (nM)	SSTR3 (nM)	SSTR4 (nM)	SSTR5 (nM)
SST14	1,88	0,016	0,25	1,55	0,76
rCST14 (21)	7,47	0,091	2,72	7,54	3,48
[L-Msa6_D-Trp7_L-Thr11]-CST14 (22)	13,4	0,014	5,10	65,0	14,9
octanoil-[L-Msa6_D-Trp7_L-Thr11]-CST14 (23)	140	0,082	32,0	210	>100
[L-Msa5_D-Trp7_L-Thr11]-CST14 (24)	11,2	0,24	0,62	8,59	2,58
octanoil-[L-Msa5_D-Trp7_L-Thr11]-CST14 (25)	25,0	16,0	0,91	2,39	0,53
[L-Dfp7_D-Trp8]-SST14 (2)	14,0	0,36	1,10	12,0	2,10

Tabla 7.6. Datos de afinidad frente a los SSTR1-5.

Como se puede comprobar, los valores de **2** y **25** son muy similares para SSTR3, coherente con nuestra propuesta de la cercanía de tres anillos aromáticos; la peculiar disposición tridimensional de **24** podría ser la causa de su perfil farmacológico favorecido hacia SSTR3 y SSTR4. Al incluir el aminoácido Msa en sexta posición (derivados **22** y **23**), ambos análogos cuentan con un perfil de afinidad parejo: presentan un perfil de unión a SSTR2 similar, alcanzando los niveles de Ki de la somatostatina, como ocurre con su análogo [L-Msa7_D-Trp8]-SST.²⁴ Además, se pierde capacidad de unión en gran medida con SSTR4 y SSTR5, un comportamiento similar a los análogos de somatostatina que cuentan con Msa7 en su estructura. Es decir, que se trata de un patrón común independientemente de la familia de péptidos.

En relación al mecanismo celular que medie este proceso, es conocido que las células T del sistema inmune expresan SSTR2 en su membrana.^{5,43} Sin embargo, la afinidad de **25** con SSTR2 es tres órdenes de magnitud peor que la SST14 natural. Al analizar el perfil de actividad de los derivados de cortistatina, y comparándolos entre sí y con el derivado **2**, se observa que la actividad inhibitoria sobre citoquinas pro-inflamatorias no se puede explicar únicamente

⁴² Datos obtenidos por Eurofins Scientific.

⁴³ a) D. E. Elliott, A. M. Blum, J. Li, A. Metwaki, J. V. Weinstock, *J. Immunol.*, **1998**, *160*, 3997-4003; b) D. E. Elliott, A. Metwaki, A. M. Blum, M. Sandor, R. Lynch, J. V. Weinstock, *J. Immunol.*, **1994**, *153*, 1180-1186.

mediante mecanismos celulares SSTR-dependientes, dado que los dos receptores sobre los que **2** y **25** tienen mayor actividad, esto es SSTR3 y SSTR5, son igualmente ligados a **24** en estos ensayos. Por tanto, el uso de moléculas accesorias anteriormente mencionado¹⁵ podría ser el proceso que explicase esta actividad, mediada por la disposición tridimensional concreta que el clúster aromático ofrece, iniciando conjuntamente la cascada intracelular de señalización. Al mismo tiempo, se podría plantear la hipótesis de que otros receptores, identificados o no, participen en el proceso de reconocimiento en células inflamatorias, y que el mecanismo implicado requiera una tridimensionalidad de tipo núcleo aromático para ser activado. Para estudiar estas hipótesis, serían necesarios nuevos modelos que reprodujesen la estructura clúster, comprobando tanto su actividad inmunorreguladora como su perfil de unión a SSTR1-5.

7.6. Conclusiones.

Se ha comprobado la capacidad inmunorreguladora de rCST14 (**21**), así como un derivado suyo, de estructura híbrida CST-SST, octanoil-[L-Msa5_D-Trp7_L-Thr11]-CST14 (**25**). Tanto en los ensayos *in vitro* como *in vivo* demostró una elevada eficacia terapéutica, potencialmente explotable.

Se ha demostrado que la introducción en la estructura de CST14 de residuos de Msa en posición variable 5 y 6 restringe hacia una conformación posible en disolución. Además, el hecho de incluir un residuo octanoílo N-terminal también influye en dicha estructura. Para las estructuras estudiadas, [L-Msa6_D-Trp7_L-Thr11]-CST14 (**22**), octanoil-[L-Msa6_D-Trp7_L-Thr11]-CST14 (**23**) y [L-Msa5_D-Trp7_L-Thr11]-CST14 (**24**) presentan una conformación restringida a enfrentar los residuos aminoácidos aromáticos 5 y 10 en una cara de la molécula, mientras que el aminoácido 6 se posiciona en la cara contraria. Mientras, octanoil-[L-Msa5_D-Trp7_L-Thr11]-CST14 (**25**) es la única estudiada que presenta una disposición tipo clúster, análogamente a [L-Msa6_D-Trp8]-SST. El producto de degradación de octanoil-[L-Msa5_D-

Trp7_L-Thr11]-CST14 (**25**), esto es, octanoil-[L-Msa5_D-Trp7_L-Thr11]-CST13 (**26**), pierde solubilidad considerablemente lo que impide su estudio mediante RMN en condiciones similares a las empleadas en el resto de derivados.

Al probar un análogo de SST previamente estudiado en esta tesis, [L-Dfp7_D-Trp8]-SST14 (**2**), con una conformación tridimensional tipo clúster, se ha visto que emula de manera equiparable los valores de actividad biológica inmunorreguladora obtenidos por octanoil-[L-Msa5_D-Trp7_L-Thr11]-CST14 (**25**), a pesar de que la SST14, en los mismos ensayos, demostró su inacción.

Esto no sólo lleva a reconsiderar las opciones terapéuticas de los análogos de SST, sino que podría suponer un paso importante para establecer una relación de estructura-actividad de estos análogos, así como determinar de manera indirecta una posible tendencia conformacional en los SST14 y CST14 nativos. Mientras que rCST14 presenta una elevada actividad inmunorreguladora, cuando se restringe espacialmente a sus derivados provocando que los anillos aromáticos en posiciones 5 y 10 queden enfrentados se anula dicha propiedad. Sólo un derivado, aquel con una posición tridimensional tipo clúster entre los anillos 5, 6 y 10, emulaba la actividad de rCST14. Al mismo tiempo, si se fuerza una conformación espacial tipo clúster en un derivado puro de SST14, para los anillos 6, 7 y 11, presenta actividad inmunorreguladora, aunque SST14 por sí misma es incapaz de llevarla a cabo.

Además, los ensayos de afinidad a receptores ejecutados sobre estos análogos no arrojan una conclusión clara de si el mecanismo por el cual se ejerce la función inmunorreguladora es SSTR-dependiente. Abre la puerta al descubrimiento de mecanismos de activación complementarios o la mediación de receptores no-SSTR.

Determinar la estructura tridimensional de rCST14 o SST14 mediante técnicas espectroscópicas es imposible debido a la alta flexibilidad que ambas estructuras muestran. A la luz de los resultados obtenidos de las estructuras de los derivados **22-25** y [L-Dfp7_D-Trp8]-SST14 (**2**) y la actividad biológica que presentan, podría plantearse la hipótesis de que, en disolución, la rCST14

tendería más fácilmente a una estructura tipo clúster que la SST14, explicando así su capacidad inmunorreguladora estudiada en este capítulo, a pesar de que ambas tengan un perfil farmacológico similar frente a SSTR1-5.

Capítulo VIII.

Conclusiones globales.

Don't believe in yourself, don't deceive with belief.

Knowledge comes with death's release.

Quicksand, David Bowie.

Se ha demostrado que la inclusión de aminoácidos no naturales pobres en electrones, concretamente L- β -3',5'-difluorofenilalanina, L- β -3'-piridilalanina y L- β -4'-piridilalanina, en posiciones 6, 7 y 11 del esqueleto de somatostatina, conducen a una conformación mayoritaria, con un perfil de actividad biológico variable. La introducción en estos péptidos de aminoácidos no naturales ricos en electrones, L- β -mesitolalanina y L- β -3',4',5'-trimetilfenilalanina, fortalece la obtención de conformaciones de elevada convergencia. Estas estructuras mayoritarias de elevado ordenamiento fueron caracterizadas mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear.

Se ha observado que la presencia de un anillo pobre en electrones en posición 7 favorece una conformación concreta, de tipo clúster, en donde los tres anillos aromáticos quedan enfrentados entre sí, gracias a la estabilización mediada por interacciones aromáticas. Además, se ha comprobado que mediante un ordenamiento tipo clúster (análogos **4**, **9**, **13** y **25**), o bien aproximando el anillo de seis miembros del D-Trp a una interacción tipo 6-11 (derivado **14**), se ve favorecida la unión con SSTR3.

Se han tratado de perfilar los factores que favorecen la unión de los péptidos estudiados con SSTR1. De la información que se extrae de la familia de la 3'Pya y de la 4'Pya, el nivel de unión vendría dado por la posición relativa de sus anillos aromáticos pobres en electrones respecto al resto de la estructura, y el tipo de interacción aromática que se da entre ellos.

Hasta ahora, la línea de investigación de nuestro grupo consideraba que tanto la orientación que tuviese el par aromático 6-11 como el grado de rigidez estructural tridimensional serían clave para la unión del péptido con SSTR2, el receptor con mayor relevancia clínica. Sin embargo, diferentes análogos estudiados en esta tesis doctoral con distintas disposiciones tridimensionales tienen un perfil de unión elevado con este receptor. Por tanto, concluimos que no sólo intervendrían los factores anteriormente mencionados, sino que también intervendrían otros, como la posición relativa de los anillos 6-11 respecto a 7 o la orientación del par D-Trp₈_Lys₉.

No obstante, la inclusión del aminoácido no natural L- β -mesitolalanina en la séptima posición de la secuencia de SST, y análogamente en la sexta posición de CST, ha demostrado en los análogos estudiados la capacidad de reducir la afinidad por SSTR4 y SSTR5, lo cual mejora el perfil de selectividad de los péptidos que la contienen hacia SSTR2, que en la mayoría de los casos mantienen unos niveles de unión que igualan o mejoran a los del octreótido.

De todos los análogos de somatostatina estudiados, **15** ha exhibido el perfil biológico más interesante, debido a su alta selectividad y afinidad por SSTR2. Al presentar una estructura de elevada convergencia conformacional en disolución, diferente al resto de análogos, mostraría las necesidades espaciales para unirse selectivamente con este receptor, ampliando así el conocimiento de estructura y actividad en SST.

Se ha comprobado la capacidad inmunorreguladora de cortistatina, que es una característica diferencial respecto a la función de la somatostatina. Ambas secuencias son bastante semejantes; a pesar de ello, dos péptidos con una estructura tipo clúster, **2** y **25** (el primero derivado de SST y el segundo de CST), igualan la capacidad inmunorreguladora de la CST. Se trataría de un mecanismo de acción mediante el cual la formación de un ordenamiento clúster sería fundamental, debido a que los análogos **22**, **23** y **24** no tienen dicha actividad ni dicha estructura. Al estudiarse los perfiles de unión con los SSTR se ha demostrado que no estaría mediado exclusivamente por un mecanismo SSTR-dependiente, dadas las semejantes afinidades por SSTR1-5 independientemente de que cuenten o no con una actividad inmunorreguladora. Por tanto, se abre la puerta al estudio de un nuevo mecanismo de acción, bien mediante la modulación de factores accesorios junto a la intervención de los SSTR, o mediante un mecanismo de receptores distintos de los SSTR canónicos.

Capítulo IX.

Parte experimental.

9.1. Síntesis de aminoácidos no naturales.

9.1.1. Métodos generales e instrumentación.

Las reacciones llevadas a cabo en disolventes anhidros se realizaron bajo atmósfera inerte de nitrógeno. El tetrahidrofurano (THF), el éter dietílico (Et₂O) o el diclorometano (CH₂Cl₂/DCM) anhidros se prepararon mediante el Solvent Purification System (SPS PS-MD-3); el resto de disolventes anhidros fueron adquiridos a la casa comercial Sigma-Aldrich. Los disolventes no anhidros fueron obtenidos de las casas comerciales Carlo Erba, Panreac o Sigma-Aldrich. Las reacciones realizadas en medio acuoso fueron hechas con agua bidestilada.

Los reactivos disponibles comercialmente fueron adquiridos de las casas Sigma-Aldrich, Alfa Aesar, Senn Chemicals, TCI America y Acros Organics, sin precisar de purificación posterior.

El avance de las reacciones se siguió mediante cromatografía de capa fina (CCF), con las láminas 60 F254 de sílice sobre aluminio. Los reveladores utilizados fueron:

- UV 254 nm y 365 nm.
- Ninhidrina: 2 g de ninhidrina en 1000 ml de acetona.
- Permanganato potásico: 3 g de KMnO₄, 20 g de K₂CO₃, 300 ml de H₂O y 5 ml de NaOH al 5% (aq).

Dependiendo de los casos, se purificaron los crudos de reacción mediante cromatografía de purificación en fase normal sobre sílice o usando el sistema de cromatografía automatizado Combiflash® de Teledyne Isco, en ambas situaciones usando gradientes hexano/acetato de etilo.

Según la temperatura de trabajo necesaria:

- Para un margen de $t = 15\text{-}25^{\circ}\text{C}$, se supuso temperatura ambiente t.a.
- Para temperaturas superiores a 25°C , se utilizó baño de silicona y aplicación de calor mediante placa calefactora.

- Para 0°C se usó baños de hielo agua. Con temperaturas de -10°C se usó o bien baños de hielo sobre salmuera o bien hielo sobre acetona.

Todas las reacciones de hidrogenación fueron hechas en un reactor Miniclave de Buchi Glas Uster AG.

Los espectros de RMN se obtuvieron mediante el uso de un equipo Varian Mercury 400. Los espectros de ^1H y ^{13}C se referenciaron automáticamente mediante el pico residual del disolvente. Los espectros de ^{19}F fueron referenciados por el espectrómetro sin usar referencia externa. Para la asignación de las señales de ^{13}C se realizaron espectros monodimensionales de ^1H y ^{13}C , y bidimensionales homonucleares COSY, HSQC y HMBC.

El proceso experimental para la síntesis de Fmoc-L-Msa-OH, Fmoc-L-Dfp-OH y Fmoc-L-Tmp-OH es el usado anteriormente en nuestro grupo.¹ Los aminoácidos no naturales Fmoc-D-Trp(boc)-OH, Fmoc-L-3'Pya-OH y Fmoc-L-4'Pya-OH se obtuvieron de manera comercial.

9.2. Síntesis de análogos de somatostatina y cortistatina.

9.2.1. Métodos generales e instrumentación.

Todos los aminoácidos naturales se fueron suministrados de la empresa BCN Peptides S.A. Los reactivos utilizados en la síntesis de péptidos fueron adquiridos de la casa comercial Sigma-Aldrich, sin precisar de purificación posterior. Los disolventes DCM y dimetilformamida (DMF) se consiguieron de las casas Panreac y Carlo Erba respectivamente. Para los distintos protocolos de síntesis se empleó agua calidad mQ obtenida por un sistema de purificación de agua ultrapura Milli-Q Advantange A10. Los péptidos SST14, CST14 y

¹ a) R. Ramón, M. Alonso, A. Riera, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2007**, *18*, 2797-2802; b) P. Martín-Gago, M. Gómez-Caminals, R. Ramón, X. Verdager, P. Martín- Malpartida, E. Aragón, J. Fernández-Carneado, B. Ponsati, P. López-Ruiz, M. Alicia Cortés, B. Colás, M. J. Macías, A. Riera, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2012**, *51*, 1820-1825; c) P. A. Martín-Gago, tesis doctoral *Synthesis of highly structured and receptor-selective tetradecapeptidic analogs of somatostatin: Fine-tuning the non-covalent interactions among their aromatic residues*, Universidad de Barcelona, 2013.

octreótido, así como los derivados **21-26**, fueron suministrados por parte de BCN Peptides S.A., que fueron sintetizados siguiendo la misma metodología aquí descrita. La resina cloruro de 2-clorotritilo fue suministrada por las marcas Iris Biotech GmbH o a Novabiochem. Para producir un cambio de ion en el péptido, se utilizó la resina de intercambio aniónico Dowex Monosphere 550A OH de The Dow Chemical Company.

Todos los experimentos homonucleares bidimensionales TOCSY (50 ms) y NOESY (200 y 350 ms) fueron realizados en un espectrómetro Bruker Avance III 600 MHz a 285 K, usando una solución acuosa tamponada de fosfato 100 mM para pH 6,5 en 10% D₂O. Concentración de péptido (TFA⁻ como contraión) = 2 mM. Además, al inicio y al final de los experimentos se realizaron sendos espectros monodimensionales ¹H para comprobar que no se hubiesen creado fenómenos de agregación y/o precipitación que pudiesen modificar la concentración disuelta de péptido.

Los crudos peptídicos fueron analizados mediante un sistema de LC-MS.² La separación de las mezclas fue conseguida mediante una columna C18 SunFire³ usando un gradiente lineal de las soluciones A (H₂O 0,05% ácido fórmico) y B (acetonitrilo 0,1% ácido fórmico) desde 10-20% hasta 100% de B durante 8 minutos a un flujo de 0,3 ml/min. Los espectros de masas se adquirieron en un m/z de 500-2000 u.m.a. en modo ion positivo usando cinco diferentes voltajes de cono (5-70V).

Los análogos de SST14 y CST14 fueron purificados mediante cromatografía en fase reversa mediante cromatografía automatizada Combiflash[®] de Teledyne Isco, utilizando columnas C18 Gold,⁴ y en gradiente de disolventes A (H₂O con 0,1% TFA) y B (acetonitrilo/H₂O 90:10 con 0,1% TFA) en 20-60% de B durante 30 minutos a un flujo constante de 8 ml/min.

² Modelo Alliance 2796 de bomba cuaternaria, detector de absorbancia dual UV/Visible Waters 2487 conectado a un modelo ESI-MS Micromass ZQ. Análisis espectral mediante el *software* Masslynx 4.0.

³ SunFire C18 fase reversa, diámetro interno 2,1 mm, tamaño de partícula 3,5 µm, longitud 100 mm. Waters.

⁴ RediSep Rf Gold[®] C18 fase reversa, tamaño de partícula 20-40 µm, tamaño de poro 100 Å. Teledyne Isco.

Otro método de purificación empleado fue mediante RP-HPLC. Los crudos fueron purificados sobre columna Aqua C18⁵ usando un gradiente lineal de 10 a 24% de B durante 1,2 minutos, seguido de un segundo gradiente de 24 a 57% en 42 minutos (flujo 1 ml/min), en un equipo Akta HPLC.

Las distintas fracciones obtenidas en las purificaciones fueron analizadas mediante MALDI-MS, usando un analizador MALDI TOF/TOF 4800 Plus (AB Sciex) calibrado con Calmix (Calmix 4700 Proteomics Analyzer Calibrating Mixture). Los espectros fueron obtenidos mediante modo TOF reflector positivo en un margen m/z de 500-2000 u.m.a. con una intensidad de láser de 4800. Los espectros fueron analizados mediante el software Data Explorer.⁶

Los análisis mediante espectrometría de masas de alta resolución (de sus siglas en inglés HRMS) fue llevada a cabo por la Unidad de Espectrometría de Masas (IRB Barcelona). Las muestras fueron reconstruidas a partir de liofilizados en 1,0 ml de H₂O/acetronitrilo 1:1 (1% de ácido fórmico) e introducidas mediante nanoelectrospray automático en un espectrómetro de masas LTQ-FT Ultra. Condiciones: voltaje de spray 1,7 kV, voltaje de capilar 40 V, temperatura de capilar 200°C, lente de tubo 120 V, rango de m/z 200 - 2000 u.m.a., ionización positiva. Los datos fueron adquiridos mediante el *software* Xcalibur,⁷ así como la composición elemental desde los valores experimentales de la masa exacta monoisotópica obtenida del mismo programa; la deconvolución iónica para masas monoisotópicas con carga cero fue realizada utilizando el algoritmo Xtract de dicho *software*.

9.2.2. Consideraciones generales para la síntesis de péptidos en fase sólida.

Los distintos análogos peptídicos fueron sintetizados siguiendo la estrategia de síntesis de péptidos en fase sólida, realizada en reactores de

⁵ Aqua C18 fase reversa, diámetro interno 4,6 mm, tamaño de partícula 5 µm, tamaño de poro 125 Å longitud 150 mm. Phenomenx.

⁶ Data Explorer versión 4.6 (Applied Biosystems GmbH).

⁷ Xcalibur software versión 2.0SR2 (ThermoScientific).

polipropileno con un filtro poroso de polietileno y enganchadas a un sistema recolector de vacío, mediante el método Fmoc/^tBu.⁸ El volumen de los reactores usados fue de 5, 10 o 20 ml en función de la escala utilizada. Para llevar a cabo los pasos sintéticos o de lavado, los disolventes con o sin reactivos se añadieron y se agitaron utilizando un agitador orbital.

Con el objetivo de acoplar el primer aminoácido, una cantidad conocida de resina se hinchó en DCM anhidro y se le añade 0,3 eq de Fmoc-a.a.-OH y 0,75 eq de DIPEA disueltos en DCM anhidro. Tras determinar la carga de la resina mediante monitorización en UV de la liberación de Fmoc a 301 nm, se capó el resto de resina que no hubiese reaccionado con metanol. Para proceder con la desprotección del grupo N-Fmoc una vez finalizado un acoplamiento, se utilizó la estrategia de liberación de lavados usando piperidina en DMF al 40% durante 5 minutos y piperidina en DMF al 20% durante 10 minutos.

Los lavados realizados tras las operaciones de acoplamiento o desprotección del N-terminal consistieron en aplicar seis veces DMF, dos DCM y posterior equilibración con DMF.

La finalización de los acoplamientos y la desprotección del grupo N-Fmoc fueron seguidas mediante la realización del test de ninhidrina o test de Kaiser.⁹ Así, tras terminar el lavado con DCM, se tomó una pequeña cantidad de resina en un vial, al cual se le añaden 2,5 µl de solución A (40 g de fenol en 10 ml de EtOH), 5,0 µl de B (20 ml de KCN aq 10 mM en 100 ml de piridina) y 2,5 µl de C (2,5 g de ninhidrina en 50 ml de EtOH). Se calentó a 120°C durante 3 minutos y se observó la coloración de la resina o el sobrenadante: un color azul indica positivo para aminas libres (acoplamiento incompleto/ desprotección finalizada), mientras que un color amarillo señala la ausencia de aminas primarias libres, por tanto respuesta negativa (acoplamiento terminado). Debido a la alta sensibilidad de este ensayo, un resultado negativo garantiza un acoplamiento superior al 99,5%.

⁸ G. B. Fields, R. L. Noble, *Int. J. Protein Res.*, **1990**, *35*, 161-214.

⁹ E. Kaiser; R. L. Colescott; C. D. Bossinger; P. I. Cook, *Anal. Biochem.*, **1970**, *34*, 595-598.

9.2.3. Método general de síntesis de análogos de somatostatina y cortistatina.

Utilizando la estrategia de síntesis Fmoc/tBu, se utilizó cantidades variables de resina (0,2 - 1,0 g) de diferentes concentraciones (0,8 - 1,6 mmol/g). Para la cantidad de resina usada, se hinchó en DCM anhidro durante 30 minutos, y se añadieron 0,3 eq de Fmoc-L-Cys(trt)-OH o Fmoc-L-Lys(boc)-OH, 0,75 eq de DIPEA en DCM anhidro en agitación durante 45 minutos. Tras determinar la carga inicial de resina mediante UV se caparon los restos -Cl de la resina mediante MeOH. Una vez hechos los lavados y la desprotección del resto N-terminal mediante piperidina en DMF, se añadió el segundo Fmoc-L-a.a.-OH (4,0 eq con respecto a la carga determinada), HOBt (3,9 eq) y DIC (3,9 eq) en DMF durante 60 minutos, chequeando el fin del acoplamiento mediante el test de Kaiser. En caso de ser necesario reacoplar, se utilizó el método de acoplamiento de Fmoc-L-a.a.-OH (4,0 eq), HATU (3,9 eq) y DIPEA (8,0 eq).¹⁰ Cuando se encuentra completamente acoplado y desprotegido el extremo N-Fmoc, se continúa con esta estrategia hasta el aminoácido C-terminal. Para los aminoácidos no naturales, el número de equivalentes en la adición fue reducido a 3,0 eq, ajustando el resto de cantidades.

La liberación del péptido lineal completo se realizó mediante la adición de la mezcla de escisión (DCM/TFE/AcOH en proporciones 70:20:10 v/v) durante dos horas. La formación del puente disulfuro se creó mediante la oxidación provocada por el I₂ (10 eq) en solución a temperatura ambiente durante 15 minutos, la cual se para con la adición de Na₂S₂O₃ 1N. Se extrajo con DCM y las fases orgánicas combinadas se lavan con una mezcla de ácido cítrico/NaCl 1:1 en agua al 5%, y se evaporaron a presión reducida. Para desproteger las cadenas laterales, se generó una acidólisis mediada por una disolución de TFA (TFA/DCM/anisol/H₂O 55:30:10:5 v/v) durante 4 horas, lavándose con heptano y precipitando el péptido mediante la adición gota a gota de la mezcla anterior

¹⁰ Dicha estrategia no es aplicable para reacoplar Fmoc-L-Cys(trt)-OH, Fmoc-L-Ser(^tBu)-OH o Fmoc-L-Asn-OH, en los dos primeros casos debido a la racemización inducida por DIPEA, y en el tercero por la formación de productos de autocondensación.

sobre Et₂O a -10°C. Filtrando, se recuperó el péptido para su posterior liofilización, purificación y análisis.

Para llevar a cabo el intercambio iónico de TFA⁻ a AcO⁻, se disolvieron los péptidos ya puros en una disolución acuosa de AcOH 0,1 N, se pasaron sobre una resina de intercambio iónico DOWEX y se recuperaron por filtración, liofilizando la fase acuosa resultante.

9.2.4. Métodos biológicos empleados.

Ensayos de afinidad de análogos de SST y CST en SSTR1-5: Se empleó la línea celular CHO-K1, las cuales expresaban independientemente cada uno de los cinco SSTR. Las membranas aisladas de las células en presencia de tampón biológico de ensayo¹¹ fueron incubadas junto a una concentración fija de radioligando [¹²⁵I-Tyr11]-SST14 y los análogos en una concentración de 10⁻¹² a 10⁻⁶ M durante una hora a 30°C. La radiactividad obtenida con sólo [¹²⁵I-Tyr11]-SST14 es considerada unión total, en presencia de 1 µM de SST14 unión no específica, y la diferencia de ambas la unión específica. Las Ki de cada compuesto fueron determinadas según describieron Cheng y Prusoff.¹² Estos ensayos fueron realizados por la compañía Eurofins Scientific,¹³ bajo las condiciones descritas.

Efecto de nuevos análogos de cortistatina respuestas inmunes *in vitro*: esplenocitos a partir de bazo de ratones macho C57BL de 8 semanas de edad se extrajeron por disociación celular mecánica, filtración usando un filtro de nylon y de lisis de glóbulos rojos. Las células de bazo se incubaron en medio DMEM completo hasta una densidad de 10⁶ células/ml. Las células no adherentes (formada por 80% en células T) se utilizaron para determinar los ensayos de citoquinas y la proliferación. Las células T se cultivaron en DMEM completo y se estimularon con anticuerpo anti-CD3 (2 µg/ml) en presencia de **21** y de sus

¹¹ Mezcla de Tris 50 mM (pH 7,4), EDTA 1mM, MgCl₂ 5mM, leupeptina (10 µg/ml), pepstatina (10 µg/ml), bacitracina (200 µg/ml), aprotinina (0,5 µg/ml) y 0,2% de BSA.

¹² Y. Cheng, W. H. Prusoff, *Biochem. Pharmacol.* **1973**, *22*, 3099-3108.

¹³ Eurofins Panlabs Inc., de Eurofins Scientific.

análogos **22-25**, así como **2** (100 nM). Después de 48 horas, se aislaron los sobrenadantes de cultivo y los niveles de citoquinas (IFN γ e IL-2) se determinaron por ELISA. Para determinar el efecto de diferentes análogos de cortistatina en la proliferación, las células se cultivaron durante 72 horas, y una cantidad de [3 H]-timidina (0,5 μ Ci ó 0,0185 MBq) por pocillo se añadió durante las últimas 8 horas de cultivo. Se recogieron las membranas y la [3 H]-timidina incorporada se cuantificó por recuento de centelleo. Estos ensayos biológicos y los mostrados a continuación fueron realizados por el grupo de investigación del Dr. Mario Delgado.¹⁴

Efecto de nuevos análogos de cortistatina en la respuesta inflamatoria *in vitro*:¹⁹ células de la línea RAW 264 se cultivaron en medio DMEM completo hasta alcanzar una confluencia del 80%. Las células se incubaron en ausencia o presencia de lipopolisacárido (LPS, 1 g/ml, a partir de *E. coli* serotipo 055:B5). Las células incubadas en ausencia de lipopolisacárido se utilizaron como referencia (línea de base). **21**, así como sus análogos **22-25**, y también **2**, se añadieron a una concentración de 100 nM en el inicio del cultivo. A las 24 horas se recogieron los sobrenadantes y se determinaron los niveles de citocinas y óxido nítrico. El nivel de citocinas (TNF α e IL-6) se determinó por ELISA. La cantidad de óxido nítrico (NO) se determinó mediante el ensayo de Griess. Volúmenes iguales de sobrenadantes de cultivo (90 μ l) y reactivo de Griess se mezclaron y se midió la absorbancia a 550 nm. La cantidad de nitrito se calcula en relación con una curva estándar de NaNO $_2$.

Modelo de artritis inducida por colágeno (CIA) en ratones:¹⁹ colágeno de pollo tipo II en adyuvante completo de Freund y *Mycobacterium tuberculosis* fueron administrados a ratones DBA/1 en los días 0 y 21. Entre los días 25 y 29 los ratones fueron tratados por vía subcutánea con solución salina (control) o con 0,4 mg/kg de los compuestos **2**, **25** y **26** una vez al día. Como tratamiento de referencia un anticuerpo anti-TNF α se inyectó i.v. en los días 25 y 32. Se analizó

¹⁴ Dr. Mario Delgado Mora, grupo *Neuroinmunología de enfermedades inflamatorias y autoinmunes*, Instituto de Parasitología y Biomedicina López - Neyra, Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

el grado clínico de la artritis diaria alcanzada numerado de 0 a 10 de acuerdo con la gravedad de la lesión. La inflamación de la pata se evaluó mediante la medición de su grosor con un calibre a lo largo del estudio cada 5 días (días 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50).

Modelo experimental de la enfermedad de Crohn:¹⁹ Para realizar el estudio se utilizaron ratones machos de la línea BALB/c de 6-8 semanas. Se les administró ácido trinitrobenzenosulfónico (TNBS) en etanol al 50% por vía rectal para inducir la colitis. Los ratones de control recibieron 50% de etanol. Los ratones se trataron por vía subcutánea con vehículo (PBS) o con los análogos **2** y **25** (0,4 mg/kg) en los días 3, 4 y 5, cuando ya se había establecido la enfermedad. Los animales se observaron diariamente y la ocurrencia de diarrea (grado de colitis) se midió utilizando una escala de 0 a 4, se controló la pérdida de peso y supervivencia. Además, en la necropsia (día 10 de ensayo), fueron evaluados y calificados por lesiones macroscópicas utilizando una escala de 0 a 10 sobre la base de criterios que reflejen la inflamación, hiperemia, engrosamiento del colon y la extensión de la ulceración por dos investigadores independientes en un estudio ciego. La clasificación del grado de colitis, según la consistencia de las heces y el sangrado rectal, también se llevó a cabo por dos observadores independientes: 0 = apariencia normal de las heces, 1 = leve disminución de consistencia de las heces, 2 = moderado descenso de consistencia en las heces, 3 = disminución moderada de la consistencia y presencia de sangre en heces, 4 = grave y moderada / severa hemorragia en heces y diarrea acuosa.

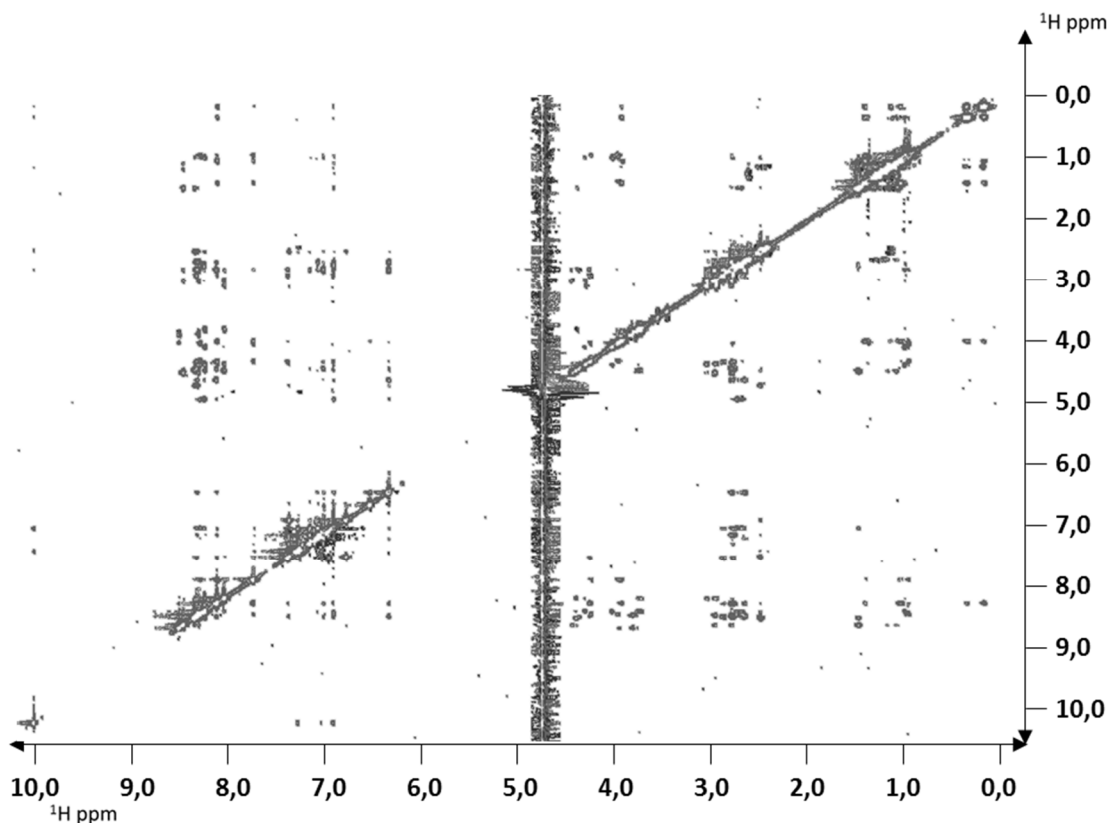
9.2.5. Análogos de somatostatina (SST14).

Familia de L-Dfp.

[L-Dfp6_D-Trp8]-SST (1): El análogo de SST14 **1** fue sintetizado siguiendo el protocolo general de síntesis usando 0,20 g de resina 2-Cl-Trt (0,80 mmol/g), usando Fmoc-Cys(trt)-OH como aminoácido C-terminal y Boc-Ala-OH como N-terminal. Se obtuvieron 80,0 mg de péptido puro. HPLC: $t_R = 16,5$ [gradiente 25-60%B en 20 minutos, flujo 1 ml/min, $\lambda=220$ nm]. HRMS: calculado para $C_{76}H_{102}F_2N_{18}O_{19}S_2$: 1672,6978; encontrado 1672,6981.

	HN	H α	H β	H γ	H δ	H ϵ	H ζ	H η
1 Ala	7,90	3,89	1,29	-	-	-	-	-
2 Gly	8,47	3,74	-	-	-	-	-	-
3 Cys	8,27	4,38	2,90 (β_2) 2,72 (β_3)	-	-	-	-	-
4 Lys	8,43	4,34	1,40	1,10 (γ_2) 1,00 (γ_3)	1,23 (δ_2) 1,17 (δ_3)	2,54	7,21	-
5 Asn	8,31	4,57	2,42	-	7,33 (δ_{21}) 6,73 (δ_{22})	-	-	-
6 Dfp	8,28	4,49	2,72 (β_2) 2,59 (β_3)	-	6,29	-	6,48	-
7 Phe	8,03	4,30	2,71	-	6,91	7,11	7,06	-
8 DTrp	8,29	4,19	2,81 (β_2) 2,70 (β_3)	-	6,87	9,98 (ϵ_1) 7,34 (ϵ_3)	7,24 (ζ_2) 6,92 (ζ_3)	7,00
9 Lys	8,08	3,87	1,32 (β_2) 0,96 (β_3)	0,27 (γ_2) 0,10 (γ_3)	1,07	2,43 (ϵ_2) 2,35 (ϵ_3)	7,23	-
10 Thr	7,70	4,18	3,91	0,88	-	-	-	-
11 Phe	8,25	4,79	2,67 (β_2) 2,61 (β_3)	-	6,86	7,03	6,97	-
12 Thr	8,21	4,24	3,97	0,91	-	-	-	-
13 Ser	8,20	4,34	3,68	-	-	-	-	-
14 Cys	8,00	4,23	2,98 (β_2) 2,89 (β_3)	-	-	-	-	-

Desplazamientos químicos en ppm para los protones detectados en espectros TOCSY y NOESY.



Espectro bidimensional homonuclear NOESY 350 ms para [L-Dfp6_D-Trp8]-SST (1).
Adquirido en un espectrómetro Bruker Avance III 600 MHz a 285 K.

Restricciones de distancia:

Intrarresidual: 0
 Secuenciales: 48
 Media distancia ($1 < \text{dist} \leq 4$): 27
 Larga distancia ($\text{dist} > 4$): 28
 Total: 99
 Restricción de ángulos diedros: 22

Estadísticas de las veinte mejores estructuras

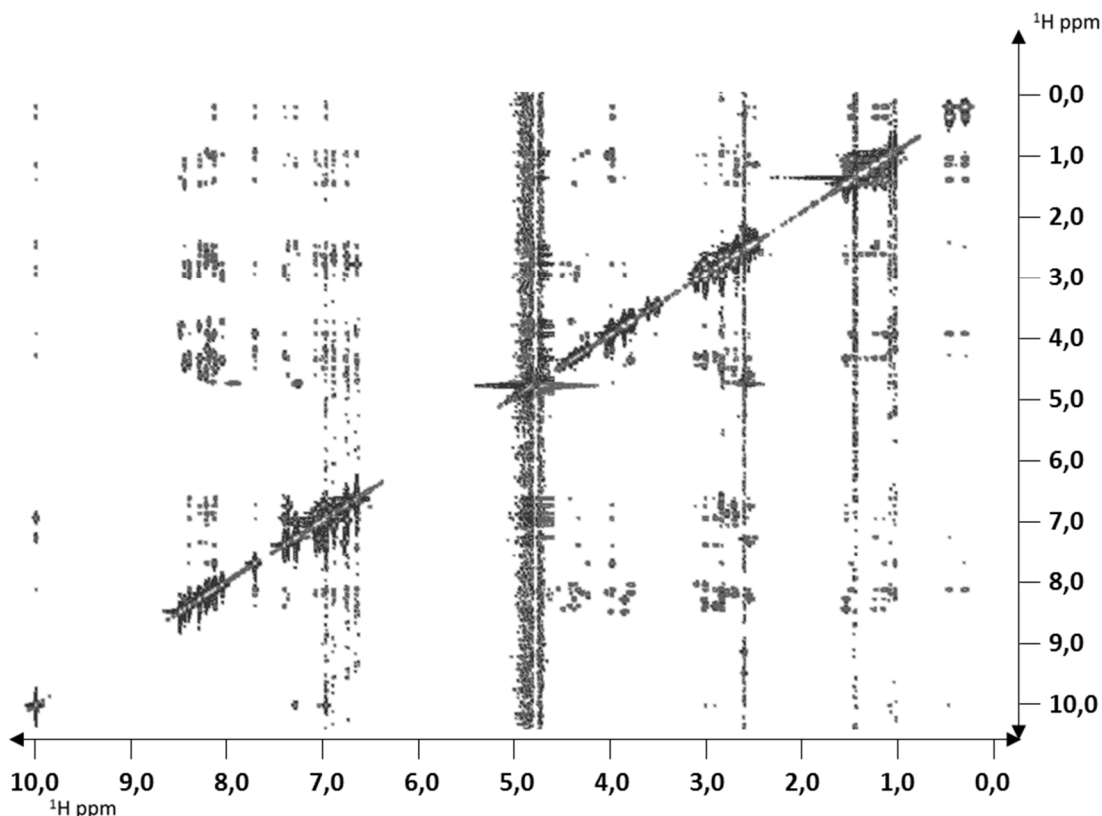
Energías (kcal/mol):	RMSD*:
Energía total: $-357,2 \pm 8,100$	Enlaces (Å): $5,913 \times 10^{-3} \pm 3,035 \times 10^{-4}$
Van der Waals: $-38,62 \pm 4,650$	Ángulos (°): $0,6805 \pm 0,02805$
Electrostática: $-447,1 \pm 10,20$	Impropios (°): $1,398 \pm 0,1449$
Enlaces: $7,991 \pm 0,822$	Diedros (°): $41,25 \pm 0,5487$
Ángulos: $28,54 \pm 2,350$	NOEs: $1,067 \times 10^{-2} \pm 7,425 \times 10^{-4}$

Estudio de parámetros de las 20 estructuras con menor energía calculadas para [L-Dfp6_D-Trp8]-SST (1). *Desviación media de las 20 estructuras de menor energía respecto a la estructura de menor energía.

[L-Dfp7_D-Trp8]-SST (2): El análogo de SST14 **2** fue sintetizado siguiendo el protocolo general de síntesis usando 0,20 g de resina 2-Cl-Trt (0,80 mmol/g), usando Fmoc-Cys(trt)-OH como aminoácido C-terminal y Boc-Ala-OH como N-terminal. Se obtuvieron 111,0 mg de péptido puro. HPLC: $t_R = 15,6$ [gradiente 25-60%B en 20 minutos, flujo 1 ml/min, $\lambda=220$ nm]. HRMS: calculado para $C_{76}H_{102}F_2N_{18}O_{19}S_2$: 1672,6978; encontrado 1672,6964.

	HN	H α	H β	H γ	H δ	H ϵ	H ζ	H η
1 Ala	-	3,90	1,29	-	-	-	-	-
2 Gly	8,47	3,75	-	-	-	-	-	-
3 Cys	8,28	4,41	2,89 (β_2) 2,73 (β_3)	-	-	-	-	-
4 Lys	8,41	4,27	1,40	1,10 (γ_2) 1,01 (γ_3)	1,26 (δ_2) 1,20 (δ_3)	2,56	7,23	-
5 Asn	8,25	4,55	2,42	-	7,31 (δ_{21}) 6,71 (δ_{22})	-	-	-
6 Phe	8,16	4,45	2,72 (β_2) 2,59 (β_3)	-	6,71	6,96	6,95	-
7 Dfp	8,04	4,34	2,71	-	6,59	-	6,72	-
8 DTrp	8,04	4,34	2,89 (β_2) 2,79 (β_3)	-	6,92	10,01 (ϵ_1) 7,25 (ϵ_3)	7,36 (ζ_2) 7,00 (ζ_3)	6,91
9 Lys	8,11	3,87	1,34 (β_2) 0,98 (β_3)	0,30 (γ_2) 0,13 (γ_3)	1,08	2,44 (ϵ_2) 2,37 (ϵ_3)	7,23	-
10 Thr	7,68	4,13	3,89	0,87	-	-	-	-
11 Phe	8,18	4,66	2,68 (β_2) 2,59 (β_3)	-	6,84	7,03	6,98	-
12 Thr	8,11	4,19	3,93	0,92	-	-	-	-
13 Ser	8,15	4,31	3,67	-	-	-	-	-
14 Cys	8,13	4,36	3,00 (β_2) 2,88 (β_3)	-	-	-	-	-

Desplazamientos químicos en ppm para los protones detectados en espectros TOCSY y NOESY.



Espectro bidimensional homonuclear NOESY 350 ms para [L-Dfp7_D-Trp8]-SST (2). Adquirido en un espectrómetro Bruker Avance III 600 MHz a 285 K.

Restricciones de distancia:

Intrarresidual: 0

Secuenciales: 63

Media distancia ($1 < \text{dist} \leq 4$): 22

Larga distancia ($\text{dist} > 4$): 10

Total: 95

Restricción de ángulos diedros: 19

Estadísticas de las veinte mejores estructuras

Energías (kcal/mol):

Energía total: $-195,3 \pm 14,12$

Van der Waals: $-13,57 \pm 7,295$

Electrostática: $-441,3 \pm 15,76$

Enlaces: $42,16 \pm 5,115$

Ángulos: $85,18 \pm 5,597$

RMSD*:

Enlaces (Å): $1,357 \times 10^{-2} \pm 8,174 \times 10^{-4}$

Ángulos (°): $1,176 \pm 0,03831$

Impropios (°): $1,91 \pm 0,1157$

Diedros (°): $42,59 \pm 0,4219$

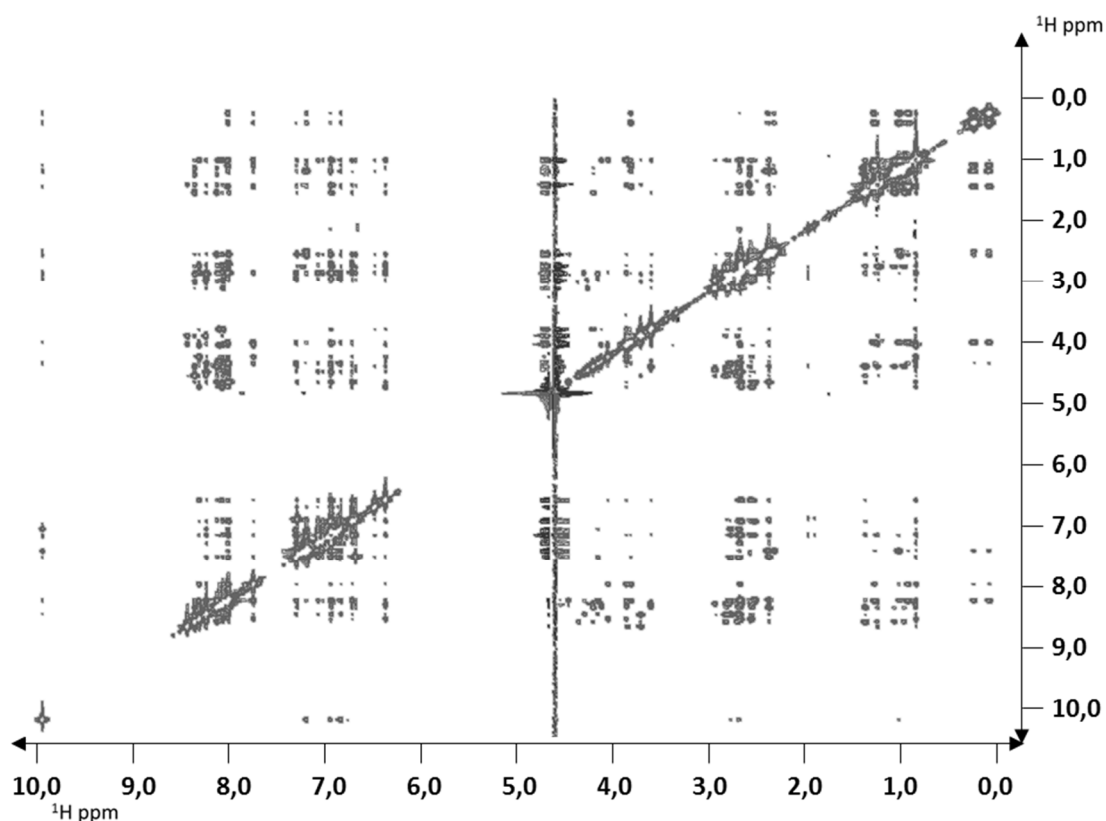
NOEs: $2,691 \times 10^{-2} \pm 2,473 \times 10^{-3}$

Estudio de parámetros de las 20 estructuras con menor energía calculadas para [L-Dfp7_D-Trp8]-SST (2). *Desviación media de las 20 estructuras de menor energía respecto a la estructura de menor energía.

[L-Dfp11_D-Trp8]-SST (3): El análogo de SST14 **3** fue sintetizado siguiendo el protocolo general de síntesis usando 0,20 g de resina 2-Cl-Trt (0,80 mmol/g), usando Fmoc-Cys(trt)-OH como aminoácido C-terminal y Boc-Ala-OH como N-terminal. Se obtuvieron 139,2 mg de péptido puro. HPLC: $t_R = 17,2$ [gradiente 25-60%B en 20 minutos, flujo 1 ml/min, $\lambda=220$ nm]. HRMS: calculado para $C_{76}H_{102}F_2N_{18}O_{19}S_2$: 1672,6978; encontrado 1672,6894.

	HN	H α	H β	H γ	H δ	H ϵ	H ζ	H η
1 Ala	7,91	3,89	1,29	-	-	-	-	-
2 Gly	8,48	3,75	-	-	-	-	-	-
3 Cys	8,28	4,41	2,88 (β_2) 2,76 (β_3)	-	-	-	-	-
4 Lys	8,40	4,26	1,43	1,13 (γ_2) 1,03 (γ_3)	1,30	2,63	7,27	-
5 Asn	8,17	4,51	2,43	-	7,33 (δ_{21}) 6,72 (δ_{22})	-	-	-
6 Phe	8,04	4,51	2,71 (β_2) 2,56 (β_3)	-	6,76	6,98	6,95	-
7 Phe	8,05	4,34	2,72	-	6,98	7,12	7,07	-
8 DTrp	8,28	4,20	2,83	-	6,88	9,98 (ϵ_1) 7,24 (ϵ_3)	7,24 (ζ_2) 6,91 (ζ_3)	7,00
9 Lys	8,05	3,87	1,33 (β_2) 0,99 (β_3)	0,30 (γ_2) 0,14 (γ_3)	1,08	2,44 (ϵ_2) 2,39 (ϵ_3)	7,23	-
10 Thr	7,79	4,10	3,92	0,89	-	-	-	-
11 Dfp	8,35	4,59	2,72 (β_2) 2,61 (β_3)	-	6,41	-	6,53	-
12 Thr	8,11	4,17	3,91	0,90	-	-	-	-
13 Ser	8,15	4,26	3,65	-	-	-	-	-
14 Cys	8,11	4,31	2,98 (β_2) 2,85 (β_3)	-	-	-	-	-

Desplazamientos químicos en ppm para los protones detectados en espectros TOCSY y NOESY.



Espectro bidimensional homonuclear NOESY 350 ms para [L-Dfp11_D-Trp8]-SST (3).
Adquirido en un espectrómetro Bruker Avance III 600 MHz a 285 K.

Restricciones de distancia:

Intrarresidual: 0

Secuenciales: 72

Media distancia ($1 < \text{dist} \leq 4$): 13

Larga distancia ($\text{dist} > 4$): 21

Total: 106

Restricción de ángulos diedros: 10

Estadísticas de las veinte mejores estructuras

Energías (kcal/mol):

Energía total: $4,570 \pm 17,83$

Van der Waals: $5,861 \pm 8,520$

Electrostática: $-407,4 \pm 11,8$

Enlaces: $45,91 \pm 6,960$

Ángulos: $182,4 \pm 14,90$

RMSD*:

Enlaces (Å): $1,357 \times 10^{-2} \pm 8,174 \times 10^{-4}$

Ángulos (°): $1,176 \pm 0,03831$

Impropios (°): $3,478 \pm 0,4543$

Diedros (°): $42,51 \pm 0,4808$

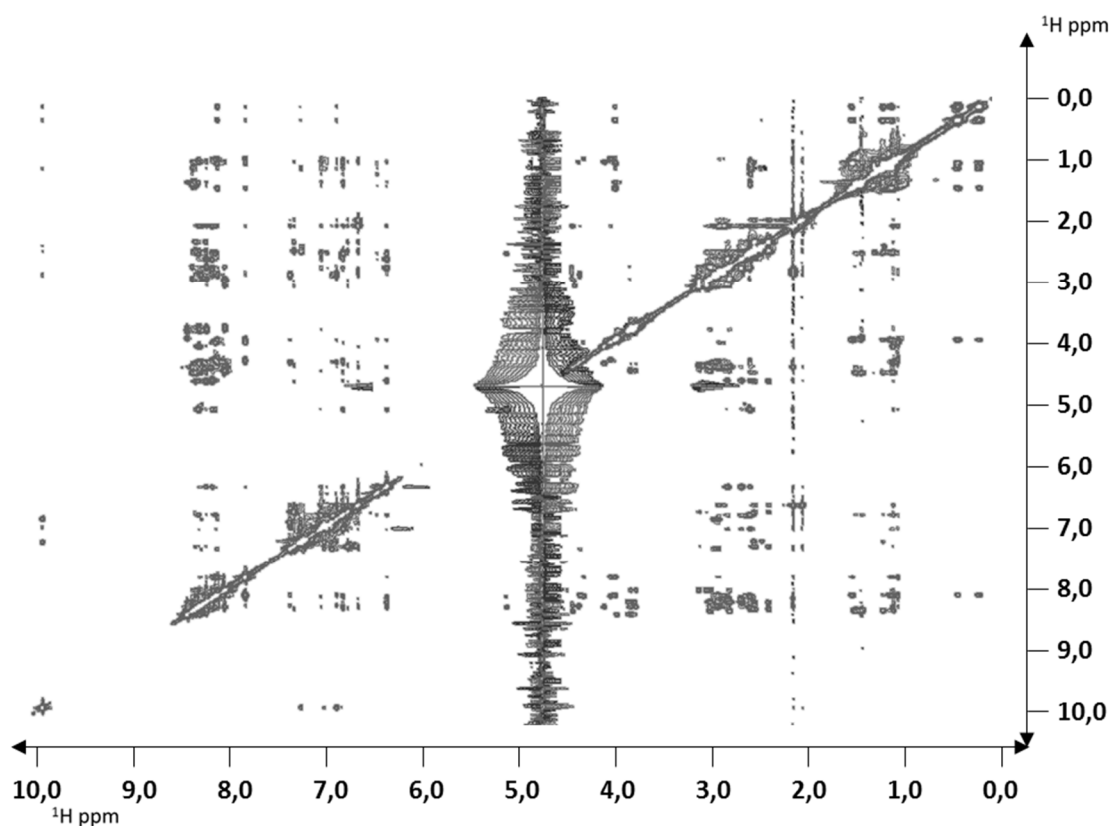
NOEs: $2,691 \times 10^{-2} \pm 2,473 \times 10^{-3}$

Estudio de parámetros de las 20 estructuras con menor energía calculadas para [L-Dfp11_D-Trp8]-SST (3). *Desviación media de las 20 estructuras de menor energía respecto a la estructura de menor energía.

[L-Dfp6_L-Msa7_D-Trp8]-SST (4): El análogo de SST14 **4** fue sintetizado siguiendo el protocolo general de síntesis usando 1,00 g de resina 2-Cl-Trt (1,60 mmol/g), usando Fmoc-Cys(trt)-OH como aminoácido C-terminal y Boc-Ala-OH como N-terminal. Se obtuvieron 0,56 mg de crudo. LC-MS: $t_R = 6,97$ [gradiente 5-100%B en 8 minutos, flujo: 0,3 ml/min, $\lambda=210-400$ nm]. HRMS: calculado para $C_{79}H_{108}F_2N_{18}O_{19}S_2$: 1714,7448; encontrado 1714,7439.

	HN	H α	H β	H γ	H δ	H ϵ	H ζ	H η
1 Ala	7,91	3,90	1,30	-	-	-	-	-
2 Gly	8,47	3,75	-	-	-	-	-	-
3 Cys	8,27	4,37	2,91 (β_2) 2,71 (β_3)	-	-	-	-	-
4 Lys	8,42	4,47	1,36 (β_2) 1,30 (β_3)	1,07 (γ_2) 0,97 (γ_3)	1,64	2,48	7,15	-
5 Asn	8,39	4,61	2,46 (β_2) 2,29 (β_3)	-	7,34 (δ_{21}) 6,76 (δ_{22})	-	-	-
6 Dfp	8,28	4,60	2,72 (β_2) 2,58 (β_3)	-	6,35	-	6,45	-
7 Msa	8,21	4,37	2,81 (β_2) 2,76 (β_3)	-	2,03*	6,66	-	1,93
8 DTrp	8,32	4,29	2,85	-	6,89	10,01 (ϵ_1) 7,38 (ϵ_3)	7,26 (ζ_2) 6,94 (ζ_3)	7,02
9 Lys	8,15	4,46	1,40 (β_2) 0,99 (β_3)	0,27 (γ_2) 0,05 (γ_3)	1,08	2,45 (ϵ_2) 2,37 (ϵ_3)	7,24	-
10 Thr	7,85	4,46	3,97	0,91	-	-	-	-
11 Phe	8,17	5,07	2,48	-	6,82	7,05	6,98	-
12 Thr	8,36	4,31	4,04	0,96	-	-	-	-
13 Ser	8,35	4,35	3,75 (β_2) 3,70 (β_3)	-	-	-	-	-
14 Cys	8,07	4,34	3,02 (β_2) 2,94 (β_3)	-	-	-	-	-

Desplazamientos químicos en ppm para los protones detectados en espectros TOCSY y NOESY. *Nótese que los H ρ de la Msa están colocados en la columna de H δ para mayor comodidad visual.



Espectro bidimensional homonuclear NOESY 350 ms para [L-Dfp6_L-Msa7_D-Trp8]-SST (4).
Adquirido en un espectrómetro Bruker Avance III 600 MHz a 285 K.

Restricciones de distancia:

Intrarresidual: 0

Secuenciales: 48

Media distancia ($1 < \text{dist} \leq 4$): 17

Larga distancia ($\text{dist} > 4$): 21

Total: 86

Restricción de ángulos diedros: 22

Estadísticas de las veinte mejores estructuras

Energías (kcal/mol):

Energía total: $-135,4 \pm 7,376$

Van der Waals: $-19,74 \pm 4,517$

Electrostática: $-438,4 \pm 14,12$

Enlaces: $25,53 \pm 1,983$

Ángulos: $138,3 \pm 4,741$

RMSD*:

Enlaces (Å): $1,037 \times 10^{-2} \pm 4,011 \times 10^{-4}$

Ángulos (°): $1,467 \pm 0,02504$

Impropios (°): $3,247 \pm 0,2407$

Diedros (°): $41,78 \pm 0,3209$

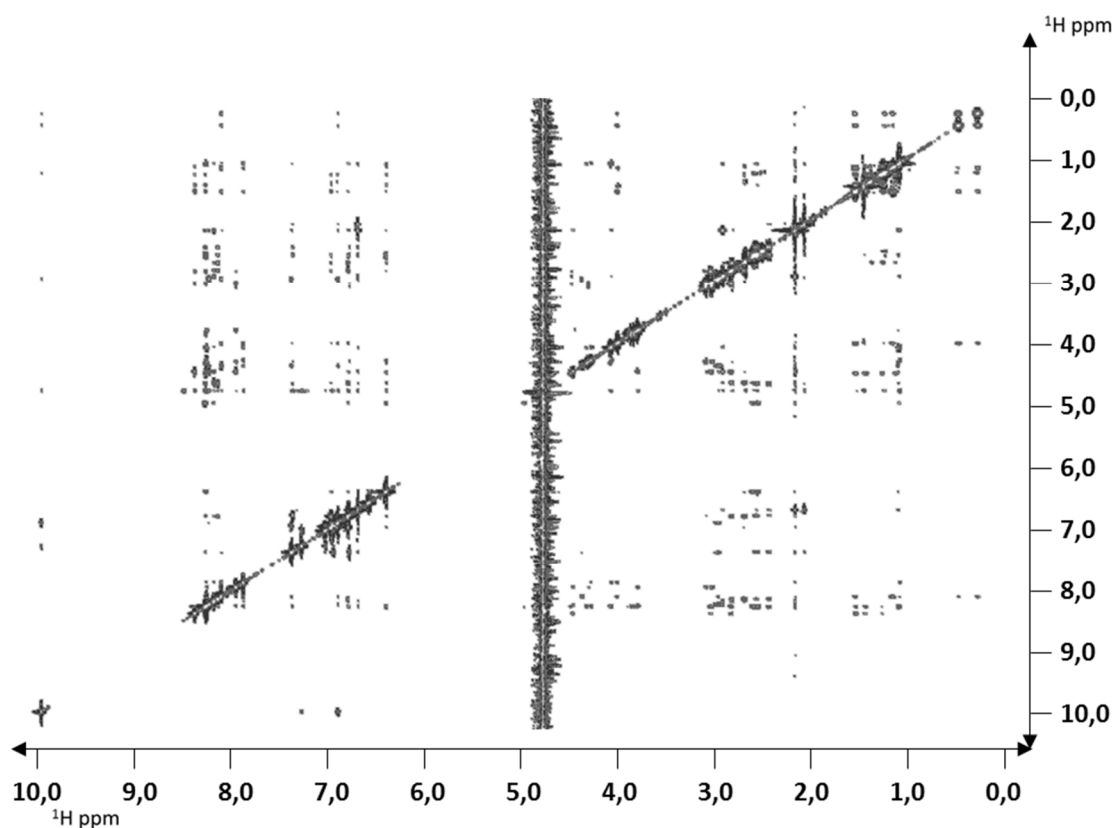
NOEs: $2,140 \times 10^{-2} \pm 8,323 \times 10^{-4}$

Estudio de parámetros de las 20 estructuras con menor energía calculadas para [L-Dfp6_L-Msa7_D-Trp8]-SST (4). *Desviación media de las 20 estructuras de menor energía respecto a la estructura de menor energía.

[L-Dfp11_L-Msa7_D-Trp8]-SST (5): El análogo de SST14 **5** fue sintetizado siguiendo el protocolo general de síntesis usando 1,00 g de resina 2-Cl-Trt (1,60 mmol/g), usando Fmoc-Cys(trt)-OH como aminoácido C-terminal y Boc-Ala-OH como N-terminal. Se obtuvieron 12,6 mg de péptido puro. LC-MS: $t_R = 7,28$ [gradiente 5-100%B en 8 minutos, flujo: 0,3 ml/min, $\lambda=210-400$ nm]. HRMS: calculado para $C_{79}H_{108}F_2N_{18}O_{19}S_2$: 1714,7448; encontrado 1714,7421.

	HN	H α	H β	H γ	H δ	H ϵ	H ζ	H η
1 Ala	7,91	3,90	1,29	-	-	-	-	-
2 Gly	8,51	3,75	-	-	-	-	-	-
3 Cys	8,27	4,38	2,92 (β_2) 2,71 (β_3)	-	-	-	-	-
4 Lys	8,39	4,40	1,39 (β_2) 1,28 (β_3)	1,10 (γ_2) 0,97 (γ_3)	1,33	2,56	-	-
5 Asn	8,28	4,58	2,44 (β_2) 2,31 (β_3)	-	7,35 (δ_{21}) 6,75 (δ_{22})	-	-	-
6 Phe	8,15	4,56	2,69 (β_2) 2,57 (β_3)	-	6,77	6,99	6,88	-
7 Msa	8,19	4,38	2,79	-	2,03*	6,66	-	1,93
8 DTrp	8,24	4,28	2,84	-	6,87	10,01 (ϵ_1) 7,36 (ϵ_3)	7,26 (ζ_2) 6,92 (ζ_3)	7,00
9 Lys	8,11	3,91	1,38 (β_2) 1,00 (β_3)	0,30 (γ_2) 0,10 (γ_3)	1,08	2,45 (ϵ_2) 2,38 (ϵ_3)	-	-
10 Thr	7,87	4,19	3,97	0,92	-	-	-	-
11 Dfp	8,27	4,90	2,48 (β_2) 2,43 (β_3)	-	6,36	-	6,54	-
12 Thr	8,29	4,23	3,99	0,94	-	-	-	-
13 Ser	8,26	4,38	3,69	-	-	-	-	-
14 Cys	7,96	4,22	2,97	-	-	-	-	-

Desplazamientos químicos en ppm para los protones detectados en espectros TOCSY y NOESY. *Nótese que los H ρ de la Msa están colocados en la columna de H δ para mayor comodidad visual.



Espectro bidimensional homonuclear NOESY 350 ms para [L-Dfp11_L-Msa7_D-Trp8]-SST (5). Adquirido en un espectrómetro Bruker Avance III 600 MHz a 285 K.

Restricciones de distancia:

Intrarresidual: 0
 Secuenciales: 96
 Media distancia ($1 < \text{dist} \leq 4$): 63
 Larga distancia ($\text{dist} > 4$): 64
 Total: 223
 Restricción de ángulos diedros: 22

Estadísticas de las veinte mejores estructuras

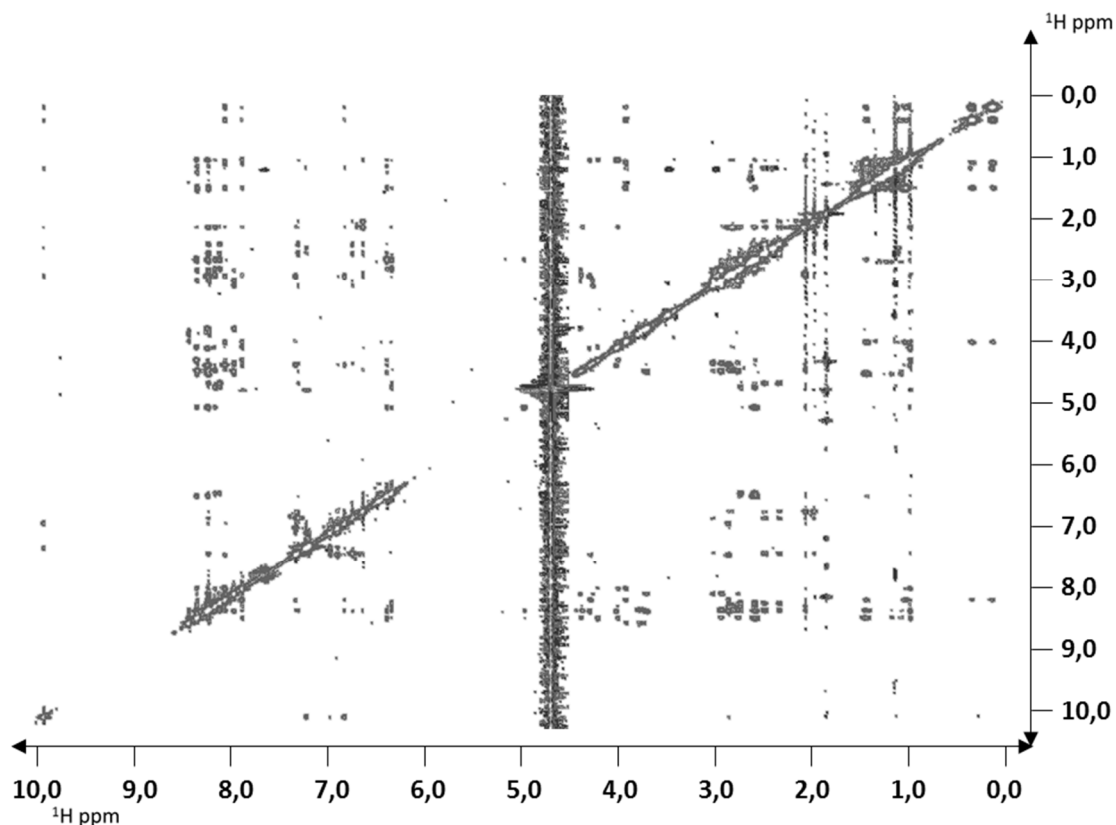
Energías (kcal/mol):	RMSD*:
Energía total: $-16,26 \pm 9,679$	Enlaces (Å): $1,213 \times 10^{-2} \pm 3,598 \times 10^{-4}$
Van der Waals: $11,33 \pm 4,447$	Ángulos (°): $1,534 \pm 0,02475$
Electrostática: $-397,5 \pm 7,754$	Impropios (°): $3,953 \pm 0,1101$
Enlaces: $34,61 \pm 2,051$	Diedros (°): $42,61 \pm 0,3222$
Ángulos: $150,2 \pm 4,870$	NOEs: $1,277 \times 10^{-2} \pm 4,352 \times 10^{-4}$

Estudio de parámetros de las 20 estructuras con menor energía calculadas para [L-Dfp11_L-Msa7_D-Trp8]-SST (5). *Desviación media de las 20 estructuras de menor energía respecto a la estructura de menor energía.

[L-Dfp6,11_L-Msa7_D-Trp8]-SST (6): El análogo de SST14 **6** fue sintetizado siguiendo el protocolo general de síntesis usando 1,00 g de resina 2-Cl-Trt (1,60 mmol/g), usando Fmoc-Cys(trt)-OH como aminoácido C-terminal y Boc-Ala-OH como N-terminal. Se obtuvieron 152,2 mg de péptido puro. HPLC: $t_R = 16,1$ [gradiente 25-60%B en 20 minutos, flujo 1 ml/min, $\lambda=220$ nm]. HRMS: calculado para $C_{79}H_{106}F_4N_{18}O_{19}S_2$: 1750,7259; encontrado 1750,7259.

	HN	H α	H β	H γ	H δ	H ϵ	H ζ	H η
1 Ala	7,90	3,89	1,30	-	-	-	-	-
2 Gly	8,48	3,75	-	-	-	-	-	-
3 Cys	8,27	4,37	2,90 (β_2) 2,73 (β_3)	-	-	-	-	-
4 Lys	8,39	4,43	1,39	1,12 (γ_2) 1,02 (γ_3)	1,23	2,59	7,25	-
5 Asn	8,27	4,58	2,45 (β_2) 2,30 (β_3)	-	7,34 (δ_{21}) 6,76 (δ_{22})	-	-	-
6 Dfp	8,16	4,64	2,70 (β_2) 2,55 (β_3)	-	6,36	-	6,47	-
7 Msa	8,21	4,35	2,80	-	2,03*	6,66	-	1,93
8 DTrp	8,28	4,28	2,82	-	6,85	10,00 (ϵ_1) 7,36 (ϵ_3)	7,36 (ζ_2) 7,00 (ζ_3)	6,93
9 Lys	8,10	3,90	1,38 (β_2) 0,97 (β_3)	0,27 (γ_2) 0,06 (γ_3)	1,07	2,45 (ϵ_2) 2,36 (ϵ_3)	7,23	-
10 Thr	7,93	4,20	3,99	0,92	-	-	-	-
11 Dfp	8,28	4,97	2,55	-	6,40	-	6,50	-
12 Thr	8,28	4,28	4,00	0,93	-	-	-	-
13 Ser	8,29	4,38	3,69	-	-	-	-	-
14 Cys	8,01	4,24	2,98 (β_2) 2,90 (β_3)	-	-	-	-	-

Desplazamientos químicos en ppm para los protones detectados en espectros TOCSY y NOESY. *Nótese que los H ρ de la Msa están colocados en la columna de H δ para mayor comodidad visual.



Espectro bidimensional homonuclear NOESY 350 ms para [L-Dfp6,11_L-Msa7_D-Trp8]-SST (6). Adquirido en un espectrómetro Bruker Avance III 600 MHz a 285 K.

Restricciones de distancia:

Intrarresidual: 0
 Secuenciales: 53
 Media distancia ($1 < \text{dist} \leq 4$): 28
 Larga distancia ($\text{dist} > 4$): 11
 Total: 92
 Restricción de ángulos diedros: 22

Estadísticas de las veinte mejores estructuras

Energías (kcal/mol):	RMSD*:
Energía total: $-308,4 \pm 9,200$	Enlaces (Å): $5,061 \times 10^{-3} \pm 3,145 \times 10^{-4}$
Van der Waals: $-308,4 \pm 9,200$	Ángulos (°): $1,104 \pm 0,01969$
Electrostática: $-452,8 \pm 9,600$	Impropios (°): $1,749 \pm 0,2341$
Enlaces: $6,093 \pm 0,758$	Diedros (°): $40,13 \pm 0,3457$
Ángulos: $78,41 \pm 2,817$	NOEs: $5,899 \times 10^{-3} \pm 1,354 \times 10^{-3}$

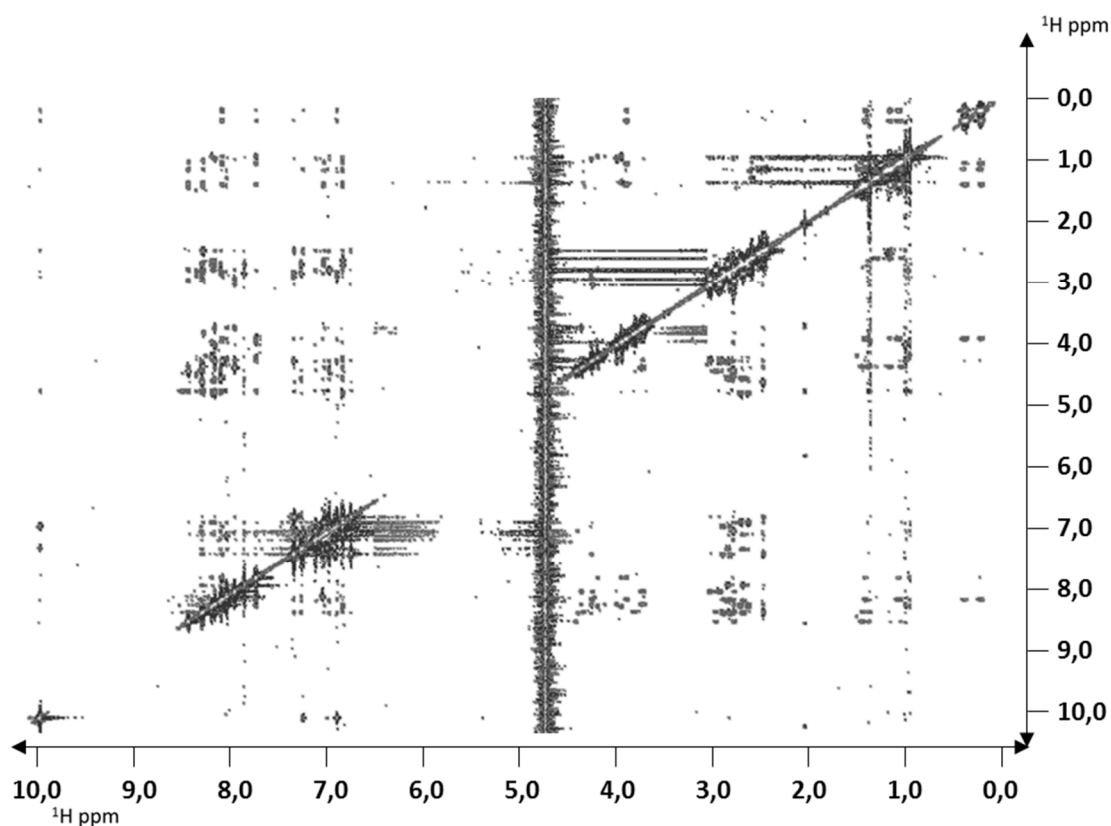
Estudio de parámetros de las 20 estructuras con menor energía calculadas para [L-Dfp6,11_L-Msa7_D-Trp8]-SST (6). *Desviación media de las 20 estructuras de menor energía respecto a la estructura de menor energía.

Familia de L-3'Pya.

[L-3'Pya6_D-Trp8]-SST (7): El análogo de SST14 7 fue sintetizado siguiendo el protocolo general de síntesis usando 1,00 g de resina 2-Cl-Trt (1,60 mmol/g), usando Fmoc-Cys(trt)-OH como aminoácido C-terminal y Boc-Ala-OH como N-terminal. Se obtuvieron 173,6 mg de péptido puro. LC-MS: $t_R = 6,31$ [gradiente 5-100%B en 8 minutos, flujo: 0,3 ml/min, $\lambda=210-400$ nm]. HRMS: calculado para $C_{75}H_{103}N_{19}O_{19}S_2$: 1637,7119; encontrado 1637,7131.

	HN	H α	H β	H γ	H δ	H ϵ	H ζ	H η
1 Ala	-	3,89	1,29	-	-	-	-	-
2 Gly	8,51	3,75	-	-	-	-	-	-
3 Cys	8,29	4,38	2,90 (β_2) 2,72 (β_3)	-	-	-	-	-
4 Lys	8,45	4,30	1,37 (β_2) 1,30 (β_3)	1,08 (γ_2) 0,96 (γ_3)	1,24	2,53	-	-
5 Asn	8,29	4,54	2,40	-	7,33 (δ_{21}) 6,74 (δ_{22})	-	-	-
6 3'Pya	8,31	4,50	2,78 (β_2) 2,62 (β_3)	-	7,86 (δ_2) 7,26 (δ_1)	7,04	8,05	-
7 Phe	8,11	4,36	2,72	-	6,97	7,11	7,07	-
8 DTrp	8,31	4,21	2,83 (β_2) 2,76 (β_3)	-	6,89	10,01 (ϵ_1) 7,34 (ϵ_3)	7,25 (ζ_2) 6,91 (ζ_3)	6,99
9 Lys	8,09	3,84	1,33 (β_2) 0,98 (β_3)	0,29 (γ_2) 0,12 (γ_3)	1,09	2,45 (ϵ_2) 2,39 (ϵ_3)	-	-
10 Thr	7,74	4,15	3,90	0,87	-	-	-	-
11 Phe	8,20	4,72	2,64 (β_2) 2,57 (β_3)	-	6,83	7,02	6,99	-
12 Thr	8,17	4,21	3,94	0,91	-	-	-	-
13 Ser	8,17	4,32	3,68	-	-	-	-	-
14 Cys	7,96	4,20	2,96 (β_2) 2,87 (β_3)	-	-	-	-	-

Desplazamientos químicos en ppm para los protones detectados en espectros TOCSY y NOESY.



Espectro bidimensional homonuclear NOESY 350 ms para [L-3'Pya6_D-Trp8]-SST (7).
Adquirido en un espectrómetro Bruker Avance III 600 MHz a 285 K.

Restricciones de distancia:

Intrarresidual: 0

Secuenciales: 72

Media distancia ($1 < \text{dist} \leq 4$): 25

Larga distancia ($\text{dist} > 4$): 39

Total: 136

Restricción de ángulos diedros: 22

Estadísticas de las veinte mejores estructuras

Energías (kcal/mol):

Energía total: $77,81 \pm 40,55$

Van der Waals: $16,33 \pm 3,847$

Electrostática: $-470,3 \pm 41,04$

Enlaces: $33,99 \pm 1,376$

Ángulos: $180,7 \pm 5,823$

RMSD*:

Enlaces (Å): $1,229 \times 10^{-2} \pm 2,483 \times 10^{-4}$

Ángulos (°): $1,724 \pm 0,02768$

Impropios (°): $6,180 \pm 0,09345$

Diedros (°): $41,14 \pm 0,4537$

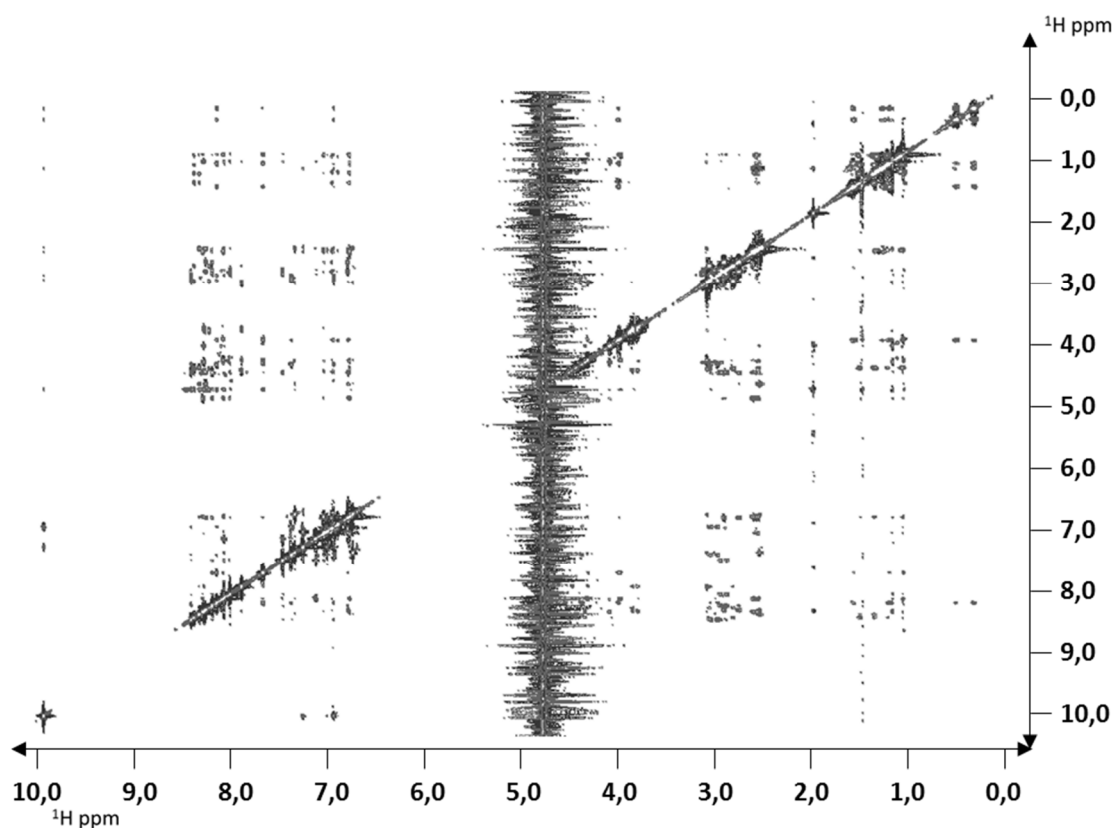
NOEs: $1,977 \times 10^{-2} \pm 4,034 \times 10^{-4}$

Estudio de parámetros de las 20 estructuras con menor energía calculadas para [L-3'Pya6_DTrp8]-SST (7). *Desviación media de las 20 estructuras de menor energía respecto a la estructura de menor energía.

[L-3'Pyra7_D-Trp8]-SST (8): El análogo de SST14 **8** fue sintetizado siguiendo el protocolo general de síntesis usando 1,00 g de resina 2-Cl-Trt (1,60 mmol/g), usando Fmoc-Cys(trt)-OH como aminoácido C-terminal y Boc-Ala-OH como N-terminal. Se obtuvieron 210,8 mg de péptido puro. LC-MS: $t_R = 5,97$ [gradiente 5-100%B en 8 minutos, flujo: 0,3 ml/min, $\lambda=210-400$ nm]. HRMS: calculado para $C_{75}H_{103}N_{19}O_{19}S_2$: 1637,7119; encontrado 1637,7096.

	HN	H α	H β	H γ	H δ	H ϵ	H ζ	H η
1 Ala	-	3,88	1,29	-	-	-	-	-
2 Gly	8,51	3,73	-	-	-	-	-	-
3 Cys	8,27	4,35	2,92 (β_2) 2,67 (β_3)	-	-	-	-	-
4 Lys	8,43	4,33	1,31 (β_2) 1,15 (β_3)	1,01 (γ_2) 0,86 (γ_3)	1,12	2,41	-	-
5 Asn	8,37	4,60	2,38	-	7,35 (δ_{21}) 6,73 (δ_{22})	-	-	-
6 Phe	8,30	4,41	2,76 (β_2) 2,61 (β_3)	-	6,78	6,95	6,89	-
7 3'Pyra	8,23	4,16	2,80 (β_2) 2,73 (β_3)	-	8,04 (δ_2) 7,48 (δ_1)	7,12	8,11	-
8 DTrp	8,46	4,28	2,91 (β_2) 2,83 (β_3)	-	6,93	10,03 (ϵ_1) 7,38 (ϵ_3)	7,26 (ζ_2) 6,92 (ζ_3)	7,01
9 Lys	8,18	3,89	1,37 (β_2) 1,00 (β_3)	0,27 (γ_2) 0,09 (γ_3)	1,07	2,44 (ϵ_2) 2,37 (ϵ_3)	-	-
10 Thr	7,70	4,22	3,87	0,84	-	-	-	-
11 Phe	8,11	4,83	2,44 (β_2) 2,41 (β_3)	-	6,77	7,04	7,00	-
12 Thr	8,32	4,25	3,98	0,96	-	-	-	-
13 Ser	8,31	4,39	3,74 (β_2) 3,68 (β_3)	-	-	-	-	-
14 Cys	7,92	4,22	2,94	-	-	-	-	-

Desplazamientos químicos en ppm para los protones detectados en espectros TOCSY y NOESY.



Espectro bidimensional homonuclear NOESY 350 ms para [L-3'Pya7_D-Trp8]-SST (8). Adquirido en un espectrómetro Bruker Avance III 600 MHz a 285 K.

Restricciones de distancia:

Intrarresidual: 0
 Secuenciales: 92
 Media distancia ($1 < \text{dist} \leq 4$): 44
 Larga distancia ($\text{dist} > 4$): 45
 Total: 181
 Restricción de ángulos diedros: 16

Estadísticas de las veinte mejores estructuras

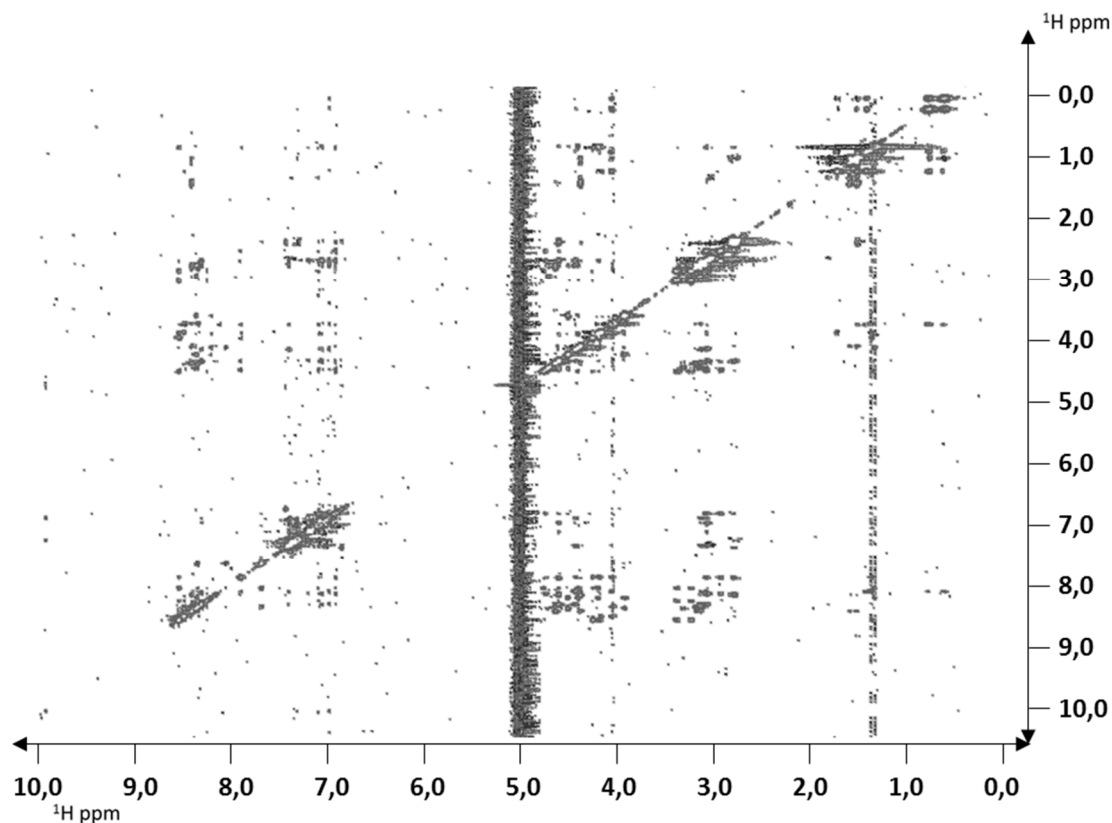
Energías (kcal/mol):	RMSD*:
Energía total: $-322,4 \pm 32,23$	Enlaces (Å): $5,794 \times 10^{-3} \pm 5,580 \times 10^{-4}$
Van der Waals: $-6,571 \pm 11,42$	Ángulos (°): $0,7489 \pm 0,09233$
Electrostática: $-456,7 \pm 34,58$	Impropios (°): $1,911 \pm 0,4105$
Enlaces: $7,620 \pm 1,390$	Diedros (°): $43,12 \pm 1,162$
Ángulos: $34,58 \pm 8,749$	NOEs: $6,495 \times 10^{-3} \pm 9,746 \times 10^{-4}$

Estudio de parámetros de las 20 estructuras con menor energía calculadas para [L-3'Pya7_D-Trp8]-SST (8). *Desviación media de las 20 estructuras de menor energía respecto a la estructura de menor energía.

[L-3'Pyra11_D-Trp8]-SST (9): El análogo de SST14 **9** fue sintetizado siguiendo el protocolo general de síntesis usando 1,00 g de resina 2-Cl-Trt (1,30 mmol/g), usando Fmoc-Cys(trt)-OH como aminoácido C-terminal y Boc-Ala-OH como N-terminal. Se obtuvieron 26,3 mg de péptido puro. LC-MS: $t_R = 7,43$ [gradiente 5-100%B en 8 minutos, flujo: 0,3 ml/min, $\lambda=210-400$ nm]. HRMS: calculado para $C_{75}H_{103}N_{19}O_{19}S_2$: 1637,7119; encontrado 1637,7105.

	HN	H α	H β	H γ	H δ	H ϵ	H ζ	H η
1 Ala	-	3,85	1,24	-	-	-	-	-
2 Gly	8,43	3,71	-	-	-	-	-	-
3 Cys	8,27	4,34	2,80 (β_2) 2,74 (β_3)	-	-	-	-	-
4 Lys	8,34	4,07	1,45 1,40	1,10 (γ_2) 1,03 (γ_3)	1,34	2,64	7,25	-
5 Asn	8,13	4,31	2,38	-	7,31 (δ_{21}) 6,69 (δ_{22})	-	-	-
6 Phe	7,80	4,45	2,68 (β_2) 2,53 (β_3)	-	6,76	6,95	6,86	-
7 Phe	8,22	4,12	2,72	-	6,91	7,05	7,01	-
8 DTrp	8,23	4,12	2,74 (β_2) 2,68 (β_3)	-	6,82	9,95 (ϵ_1) 7,28 (ϵ_3)	7,18 (ζ_2) 6,86 (ζ_3)	6,94
9 Lys	8,03	3,72	1,25 (β_2) 0,91 (β_3)	0,23 (γ_2) 0,08 (γ_3)	1,04	2,40 (ϵ_2) 2,34 (ϵ_3)	7,18	-
10 Thr	7,78	3,93	3,86	0,86	-	-	-	-
11 Phe	8,48	4,47	3,00 (β_2) 2,85 (β_3)	-	7,97 8,27	7,57	8,27	-
12 Thr	7,97	4,10	3,87	0,83	-	-	-	-
13 Ser	8,13	4,20	3,58	-	-	-	-	-
14 Cys	8,29	4,16	2,93 (β_2) 2,75 (β_3)	-	-	-	-	-

Desplazamientos químicos en ppm para los protones detectados en espectros TOCSY y NOESY.



Espectro bidimensional homonuclear NOESY 350 ms para [L-3'Pya11_D-Trp8]-SST (9).
Adquirido en un espectrómetro Bruker Avance III 600 MHz a 285 K.

Restricciones de distancia:

Intrarresidual: 0
 Secuenciales: 47
 Media distancia (1<dist≤4): 19
 Larga distancia (dist>4) : 13
 Total: 80
 Restricción de ángulos diedros: 18

Estadísticas de las veinte mejores estructuras

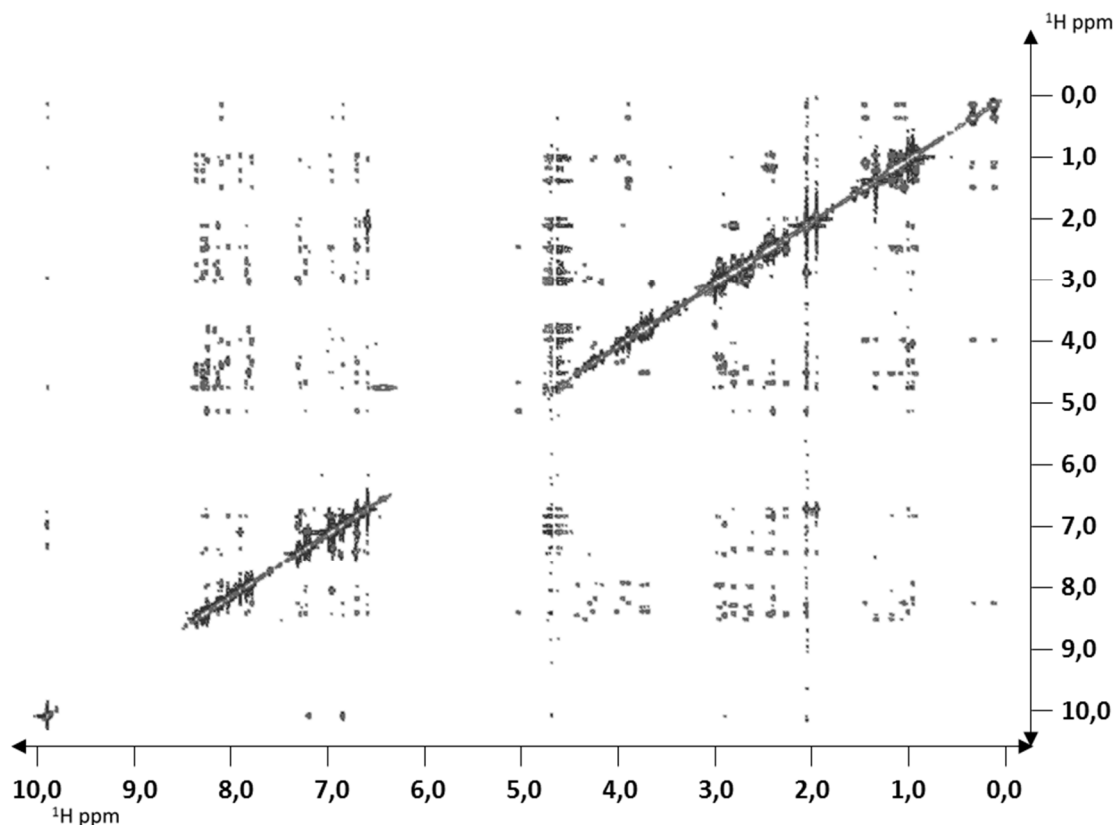
Energías (kcal/mol):	RMSD*:
Energía total: -346,7 ± 23,23	Enlaces (Å): 6,146 x10 ⁻³ ± 2,595 x10 ⁻⁴
Van der Waals: -42,33 ± 4,879	Ángulos (°): 0,7233 ± 0,02259
Electrostática: -474,9 ± 28,35	Impropios (°): 3,533 ± 0,05666
Enlaces: 8,513 ± 0,7155	Diedros (°): 41,65 ± 0,2949
Ángulos: 31,82 ± 2,016	NOEs: 1,020 x10 ⁻² ± 4,467 x10 ⁻⁴

Estudio de parámetros de las 20 estructuras con menor energía calculadas para [L-3'Pya11_D-Trp8]-SST (9). *Desviación media de las 20 estructuras de menor energía respecto a la estructura de menor energía.

[L-3'Pya6_L-Msa7_D-Trp8]-SST (10): El análogo de SST14 **10** fue sintetizado siguiendo el protocolo general de síntesis usando 1,00 g de resina 2-Cl-Trt (1,60 mmol/g), usando Fmoc-Cys(trt)-OH como aminoácido C-terminal y Boc-Ala-OH como N-terminal. Se obtuvieron 28,2 mg de péptido puro. LC-MS: $t_R = 5,34$ [gradiente 5-100%B en 8 minutos, flujo: 0,3 ml/min, $\lambda=210-400$ nm]. HRMS: calculado para $C_{78}H_{109}N_{19}O_{19}S_2$: 1679,7589; encontrado 1679,7554.

	HN	H α	H β	H γ	H δ	H ϵ	H ζ	H η
1 Ala	-	3,91	1,31	-	-	-	-	-
2 Gly	8,50	3,77	-	-	-	-	-	-
3 Cys	8,28	4,38	2,96 (β_2) 2,68 (β_3)	-	-	-	-	-
4 Lys	8,47	4,51	1,31 (β_2) 1,15 (β_3)	1,06 (γ_2) 0,90 (γ_3)	0,97	2,43	-	-
5 Asn	8,39	4,61	2,43 (β_2) 2,27 (β_3)	-	7,38 (δ_{21}) 6,79 (δ_{22})	-	-	-
6 3'Pya	8,38	4,61	2,80 (β_2) 2,63 (β_3)	-	7,94 (δ_2) 7,32 (δ_1)	7,06	8,01	-
7 Msa	8,24	4,62	2,80	-	2,03*	6,67	-	1,94
8 DTrp	8,40	4,33	2,90	-	6,93	10,01 (ϵ_1) 7,39 (ϵ_3)	7,29 (ζ_2) 6,94 (ζ_3)	7,03
9 Lys	8,20	3,92	1,43 (β_2) 1,01 (β_3)	0,29 (γ_2) 0,07 (γ_3)	1,09	2,47 (ϵ_2) 2,38 (ϵ_3)	-	-
10 Thr	7,89	4,27	3,98	0,93	-	-	-	-
11 Phe	8,13	5,08	2,39	-	6,77	7,06	7,03	-
12 Thr	8,35	4,29	4,04	0,97	-	-	-	-
13 Ser	8,35	4,45	3,78 3,72	-	-	-	-	-
14 Cys	7,92	4,20	2,99 (β_2) 2,95 (β_3)	-	-	-	-	-

Desplazamientos químicos en ppm para los protones detectados en espectros TOCSY y NOESY. *Nótese que los H ρ de la Msa están colocados en la columna de H δ para mayor comodidad visual.



Espectro bidimensional homonuclear NOESY 350 ms para [L-3'Pya6_L-Msa7_D-Trp8]-SST (10). Adquirido en un espectrómetro Bruker Avance III 600 MHz a 285 K.

Restricciones de distancia:

Intrarresidual: 0

Secuenciales: 76

Media distancia ($1 < \text{dist} \leq 4$): 26

Larga distancia ($\text{dist} > 4$): 48

Total: 150

Restricción de ángulos diedros: 14

Estadísticas de las veinte mejores estructuras

Energías (kcal/mol):

Energía total: $-381,1 \pm 23,28$

Van der Waals: $-52,92 \pm 4,774$

Electrostática: $-477,0 \pm 27,17$

Enlaces: $2,522 \pm 0,3812$

Ángulos: $69,42 \pm 2,856$

RMSD*:

Enlaces (Å): $3,274 \times 10^{-3} \pm 2,460 \times 10^{-4}$

Ángulos (°): $1,045 \pm 0,02122$

Impropios (°): $1,269 \pm 0,3037$

Diedros (°): $40,95 \pm 0,6174$

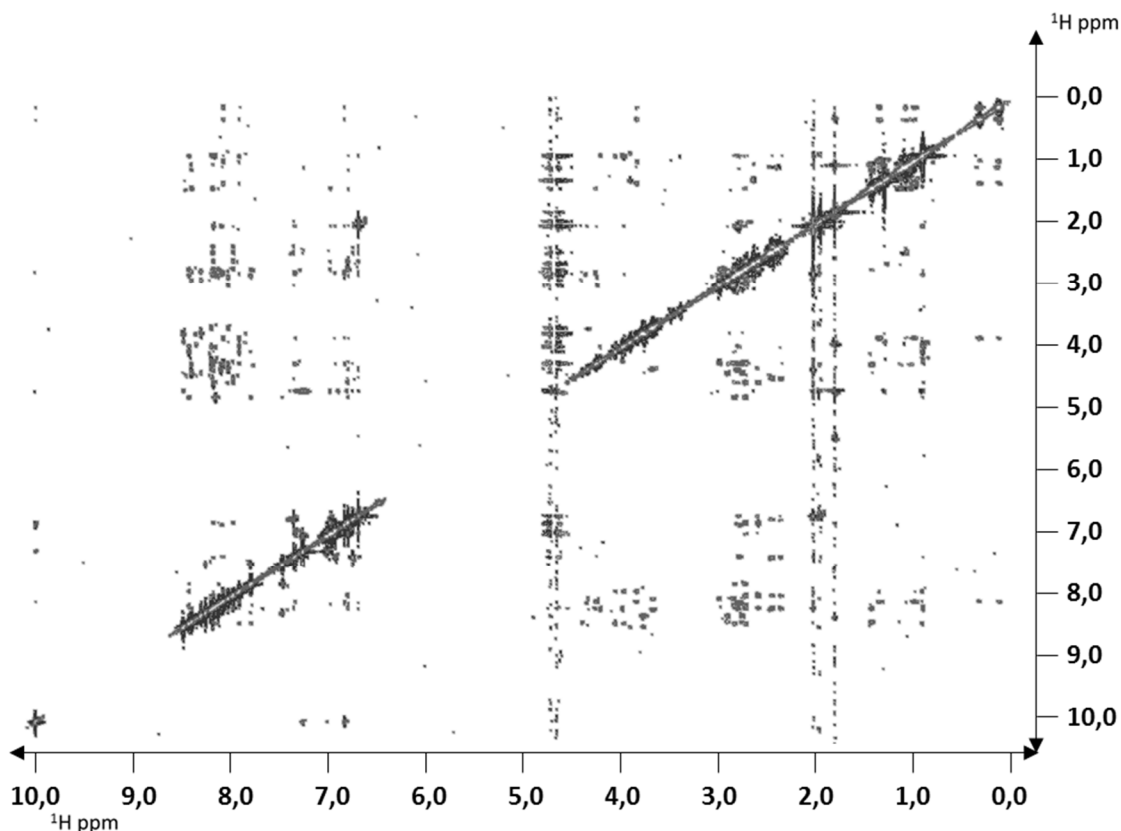
NOEs: $3,196 \times 10^{-3} \pm 3,221 \times 10^{-4}$

Estudio de parámetros de las 20 estructuras con menor energía calculadas para [L-3'Pya6_L-Msa7_D-Trp8]-SST (10). *Desviación media de las 20 estructuras de menor energía respecto a la estructura de menor energía.

[L-3'Pya11_L-Msa7_D-Trp8]-SST (11): El análogo de SST14 **11** fue sintetizado siguiendo el protocolo general de síntesis usando 1,00 g de resina 2-Cl-Trt (1,60 mmol/g), usando Fmoc-Cys(trt)-OH como aminoácido C-terminal y Boc-Ala-OH como N-terminal. Se obtuvieron 34,8 mg de péptido puro. LC-MS: $t_R = 5,62$ [gradiente 5-100%B en 8 minutos, flujo: 0,3 ml/min, $\lambda=210-400$ nm]. HRMS: calculado para $C_{78}H_{109}N_{19}O_{19}S_2$: 1679,7589; encontrado 1679,7572.

	HN	H α	H β	H γ	H δ	H ϵ	H ζ	H η
1 Ala	-	3,91	1,31	-	-	-	-	-
2 Gly	8,49	3,98	-	-	-	-	-	-
3 Cys	8,31	4,41	2,92 (β_2) 2,77 (β_3)	-	-	-	-	-
4 Lys	8,41	4,27	1,45	1,15 (γ_2) 1,07 (γ_3)	1,31	2,66	7,29	-
5 Asn	8,19	4,49	2,47 (β_2) 2,37 (β_3)	-	7,36 (δ_{21}) 6,75 (δ_{22})	-	-	-
6 Phe	7,98	4,57	2,73 (β_2) 2,61 (β_3)	-	6,80	6,98	6,97	-
7 Msa	8,18	4,36	2,81	-	2,04*	6,70	-	1,97
8 DTrp	8,10	4,25	2,79	-	6,84	10,00 (ϵ_1) 7,35 (ϵ_3)	7,26 (ζ_2) 6,94 (ζ_3)	7,01
9 Lys	8,08	4,26	1,36 (β_2) 1,01 (β_3)	0,33 (γ_2) 0,13 (γ_3)	1,10	2,48 (ϵ_2) 2,42 (ϵ_3)	7,25	-
10 Thr	7,91	4,07	3,91	0,92	-	-	-	-
11 3'Pya	8,43	4,79	2,84 (β_2) 2,73 (β_3)	-	8,14 (δ_2) 7,80 (δ_1)	7,48	8,27	-
12 Thr	8,16	4,22	3,98	0,93	-	-	-	-
13 Ser	8,20	4,32	3,68	-	-	-	-	-
14 Cys	8,03	4,26	3,00 (β_2) 2,85 (β_3)	-	-	-	-	-

Desplazamientos químicos en ppm para los protones detectados en espectros TOCSY y NOESY. *Nótese que los H ρ de la Msa están colocados en la columna de H δ para mayor comodidad visual.



Espectro bidimensional homonuclear NOESY 350 ms para [L-3'Pya11_L-Msa7_D-Trp8]-SST (11). Adquirido en un espectrómetro Bruker Avance III 600 MHz a 285 K.

Restricciones de distancia:

Intrarresidual: 0
 Secuenciales: 66
 Media distancia ($1 < \text{dist} \leq 4$): 28
 Larga distancia ($\text{dist} > 4$): 31
 Total: 125
 Restricción de ángulos diedros: 22

Estadísticas de las veinte mejores estructuras

Energías (kcal/mol):	RMSD*:
Energía total: $-304,3 \pm 9,966$	Enlaces (Å): $4,241 \times 10^{-3} \pm 3,137 \times 10^{-4}$
Van der Waals: $-39,40 \pm 5,333$	Ángulos (°): $1,086 \pm 0,01706$
Electrostática: $-429,9 \pm 11,23$	Impropios (°): $1,504 \pm 0,2625$
Enlaces: $4,267 \pm 0,6287$	Diedros (°): $41,04 \pm 0,3194$
Ángulos: $75,40 \pm 2,382$	NOEs: $4,787 \times 10^{-3} \pm 6,633 \times 10^{-4}$

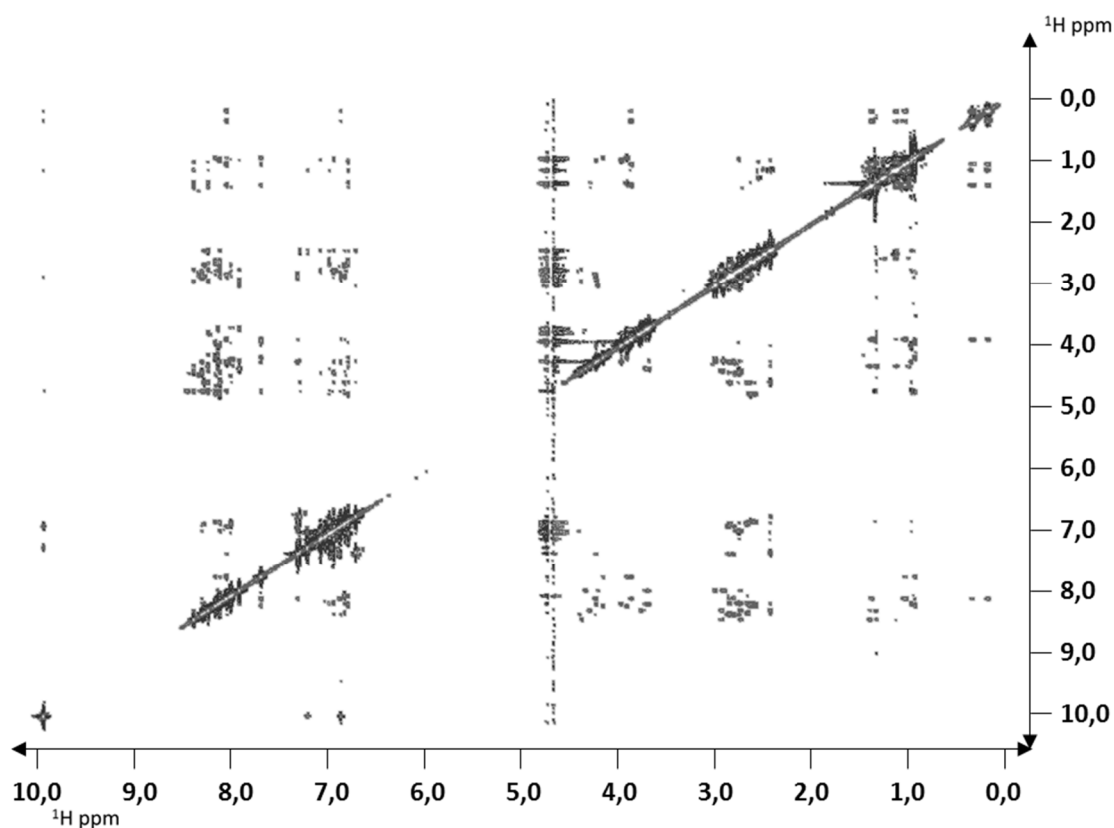
Estudio de parámetros de las 20 estructuras con menor energía calculadas para [L-3'Pya11_L-Msa7_D-Trp8]-SST (11). *Desviación media de las 20 estructuras de menor energía respecto a la estructura de menor energía.

Familia de L-4'Pyra.

[L-4'Pyra₆_D-Trp₈]-SST (12): El análogo de SST14 **12** fue sintetizado siguiendo el protocolo general de síntesis usando 1,00 g de resina 2-Cl-Trt (1,60 mmol/g), usando Fmoc-Cys(trt)-OH como aminoácido C-terminal y Boc-Ala-OH como N-terminal. Se obtuvieron 212,8 mg de péptido puro. LC-MS: $t_R = 6,21$ [gradiente 5-100%B en 8 minutos, flujo: 0,3 ml/min, $\lambda=210-400$ nm]. HRMS: calculado para $C_{75}H_{103}N_{19}O_{19}S_2$: 1637,7119; encontrado 1637,7110.

	HN	H α	H β	H γ	H δ	H ϵ	H ζ	H η
1 Ala	-	3,89	1,29	-	-	-	-	-
2 Gly	8,50	3,74	-	-	-	-	-	-
3 Cys	8,28	4,37	2,90 (β_2) 2,70 (β_3)	-	-	-	-	-
4 Lys	8,44	4,29	1,36 (β_2) 1,28 (β_3)	1,07 (γ_2) 0,95 (γ_3)	1,21	2,52	-	-
5 Asn	8,29	4,56	2,39	-	7,32 (δ_{21}) 6,74 (δ_{22})	-	-	-
6 4'Pyra	8,32	4,56	2,73 (β_2) 2,63 (β_3)	-	6,86	8,05	-	-
7 Phe	8,16	4,40	2,73	-	6,97	7,11	7,06	-
8 DTrp	8,35	4,22	2,82 (β_2) 2,79 (β_3)	-	6,89	10,01 (ϵ_1) 7,35 (ϵ_3)	7,24 (ζ_2) 6,91 (ζ_3)	6,99
9 Lys	8,09	3,85	1,32 (β_2) 0,98 (β_3)	0,27 (γ_2) 0,12 (γ_3)	1,08	2,45 (ϵ_2) 2,38 (ϵ_3)	-	-
10 Thr	7,73	4,15	3,90	0,88	-	-	-	-
11 Phe	8,21	4,73	2,60 (β_2) 2,55 (β_3)	-	6,82	7,02	6,97	-
12 Thr	8,17	4,22	3,96	0,91	-	-	-	-
13 Ser	8,18	4,33	3,68	-	-	-	-	-
14 Cys	7,96	4,20	2,97 (β_2) 2,88 (β_3)	-	-	-	-	-

Desplazamientos químicos en ppm para los protones detectados en espectros TOCSY y NOESY.



Espectro bidimensional homonuclear NOESY 350 ms para [L-4'Pya6_D-Trp8]-SST (**12**).
Adquirido en un espectrómetro Bruker Avance III 600 MHz a 285 K.

Restricciones de distancia:

Intrarresidual: 0

Secuenciales: 79

Media distancia ($1 < \text{dist} \leq 4$): 19

Larga distancia ($\text{dist} > 4$): 38

Total: 136

Restricción de ángulos diedros: 22

Estadísticas de las veinte mejores estructuras

Energías (kcal/mol):

Energía total: $-401,8 \pm 10,26$

Van der Waals: $-47,52 \pm 3,325$

Electrostática: $-460,1 \pm 11,55$

Enlaces: $3,733 \pm 0,6217$

Ángulos: $18,96 \pm 1,691$

RMSD*:

Enlaces (Å): $4,061 \times 10^{-3} \pm 3,272 \times 10^{-4}$

Ángulos (°): $0,5581 \pm 0,02463$

Impropios (°): $1,652 \pm 0,1985$

Diedros (°): $40,89 \pm 0,2725$

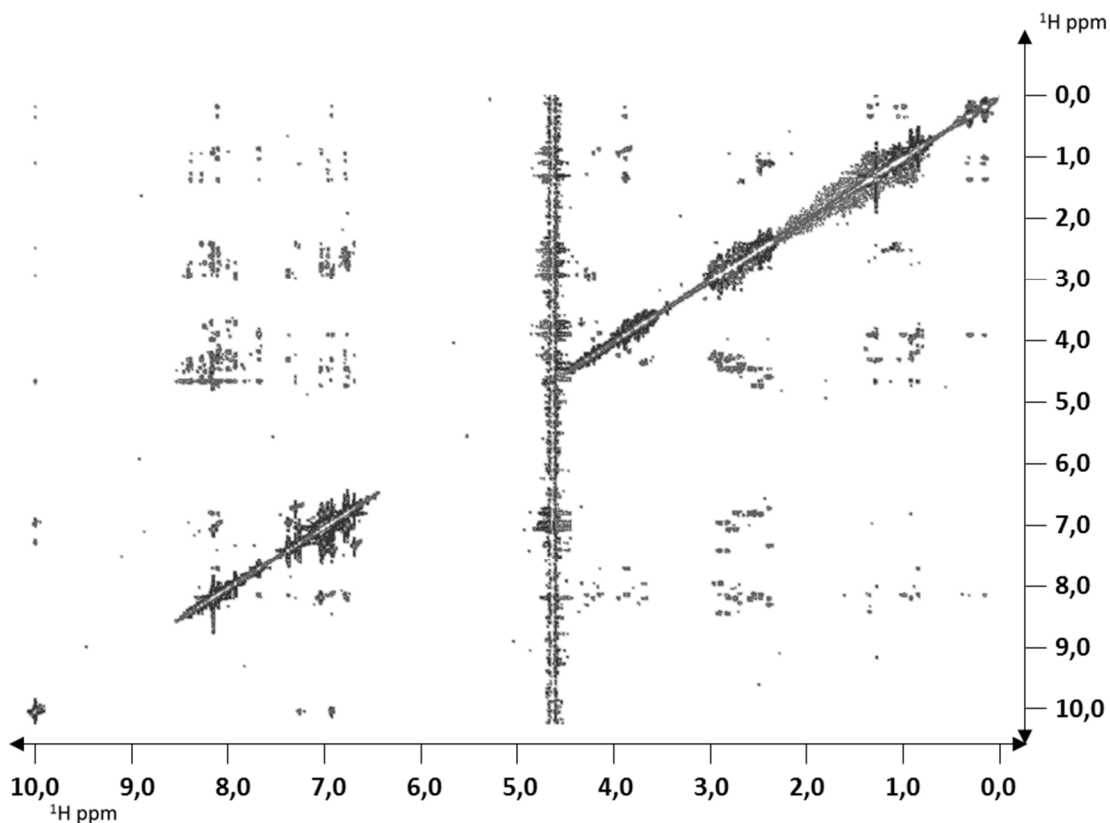
NOEs: $4,152 \times 10^{-3} \pm 5,571 \times 10^{-4}$

Estudio de parámetros de las 20 estructuras con menor energía calculadas para [L-4'Pya6_D-Trp8]-SST (**12**). *Desviación media de las 20 estructuras de menor energía respecto a la estructura de menor energía.

[L-4'Pyra7_D-Trp8]-SST (13): El análogo de SST14 **13** fue sintetizado siguiendo el protocolo general de síntesis usando 1,00 g de resina 2-Cl-Trt (1,60 mmol/g), usando Fmoc-Cys(trt)-OH como aminoácido C-terminal y Boc-Ala-OH como N-terminal. Se obtuvieron 42,4 mg de péptido puro. LC-MS: $t_R = 5,88$ [gradiente 5-100%B en 8 minutos, flujo: 0,3 ml/min, $\lambda=210-400$ nm]. HRMS: calculado para $C_{75}H_{103}N_{19}O_{19}S_2$: 1637,7119; encontrado 1637,7098.

	HN	H α	H β	H γ	H δ	H ϵ	H ζ	H η
1 Ala	-	3,95	1,35	-	-	-	-	-
2 Gly	8,53	3,81	-	-	-	-	-	-
3 Cys	8,30	4,43	2,96 (β_2) 2,75 (β_3)	-	-	-	-	-
4 Lys	8,44	4,34	1,41 (β_2) 1,32 (β_3)	1,11 (γ_2) 0,99 (γ_3)	1,26	2,56	-	-
5 Asn	8,33	4,62	2,46	-	7,36 (δ_{21}) 6,75 (δ_{22})	-	-	-
6 Phe	8,24	4,50	2,80 (β_2) 2,65 (β_3)	-	6,82	7,02	6,97	-
7 4'Pyra	8,22	4,49	2,88 (β_2) 2,80 (β_3)	-	7,10	8,21	-	-
8 DTrp	8,47	4,35	2,97 (β_2) 2,90 (β_3)	-	6,98	10,05 (ϵ_1) 7,43 (ϵ_3)	7,32 (ζ_2) 6,99 (ζ_3)	7,06
9 Lys	8,17	3,95	1,41 (β_2) 1,07 (β_3)	0,38 (γ_2) 0,23 (γ_3)	1,15	2,52 (ϵ_2) 2,45 (ϵ_3)	-	-
10 Thr	7,74	4,21	3,93	0,91	-	-	-	-
11 Phe	8,16	4,77	2,61 (β_2) 2,54 (β_3)	-	6,85	7,10	7,05	-
12 Thr	8,21	4,28	4,02	0,98	-	-	-	-
13 Ser	8,23	4,40	3,74	-	-	-	-	-
14 Cys	7,98	4,27	3,03 (β_2) 2,96 (β_3)	-	-	-	-	-

Desplazamientos químicos en ppm para los protones detectados en espectros TOCSY y NOESY.



Espectro bidimensional homonuclear NOESY 350 ms para [L-4'Pya7_D-Trp8]-SST (13).
Adquirido en un espectrómetro Bruker Avance III 600 MHz a 285 K.

Restricciones de distancia:

Intrarresidual: 0

Secuenciales: 54

Media distancia ($1 < \text{dist} \leq 4$): 20

Larga distancia ($\text{dist} > 4$): 14

Total: 88

Restricción de ángulos diedros: 22

Estadísticas de las veinte mejores estructuras

Energías (kcal/mol):

Energía total: $-269,8 \pm 24,13$

Van der Waals: $-16,97 \pm 10,34$

Electrostática: $-453,6 \pm 31,50$

Enlaces: $11,57 \pm 3,301$

Ángulos: $58,50 \pm 10,63$

RMSD*:

Enlaces (Å): $7,107 \times 10^{-3} \pm 9,740 \times 10^{-4}$

Ángulos (°): $0,9777 \pm 0,08433$

Impropios (°): $2,764 \pm 0,2818$

Diedros (°): $44,51 \pm 0,3006$

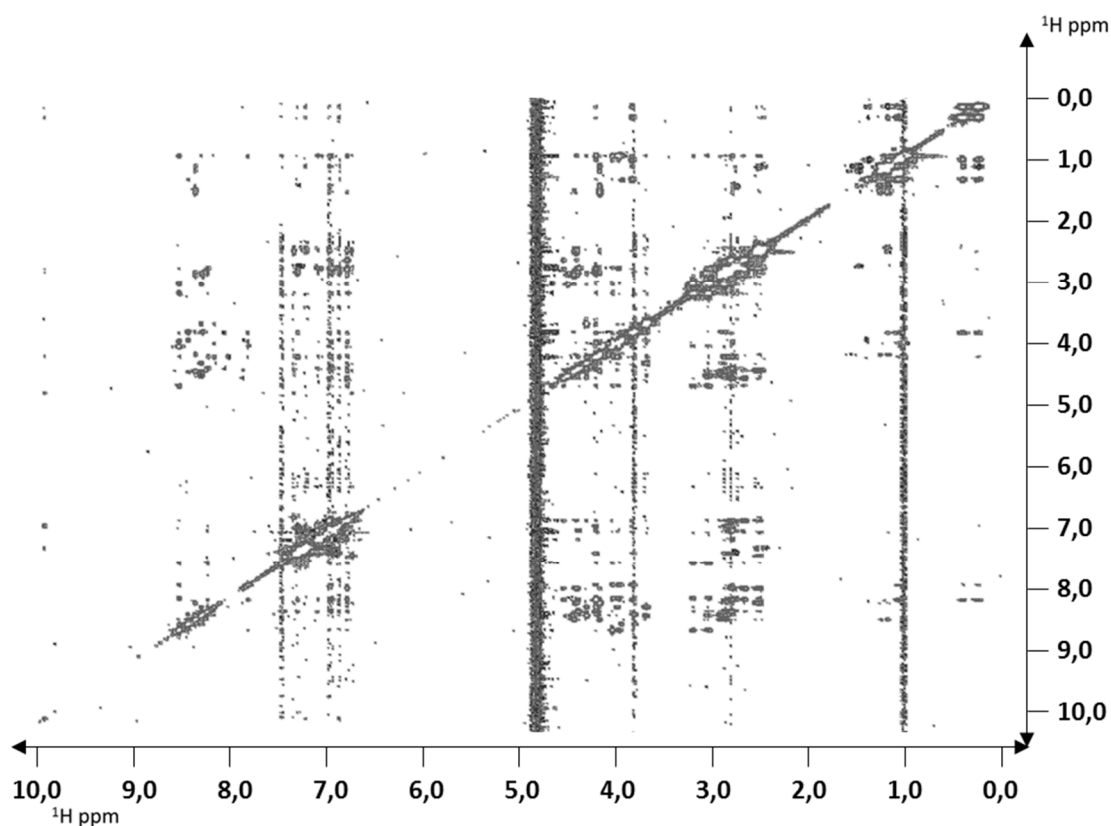
NOEs: $1,208 \times 10^{-2} \pm 1,716 \times 10^{-3}$

Estudio de parámetros de las 20 estructuras con menor energía calculadas para [L-4'Pya7_D-Trp8]-SST (13). *Desviación media de las 20 estructuras de menor energía respecto a la estructura de menor energía.

[L-4'Pyra11_D-Trp8]-SST (14): El análogo de SST14 **14** fue sintetizado siguiendo el protocolo general de síntesis usando 1,00 g de resina 2-Cl-Trt (1,30 mmol/g), usando Fmoc-Cys(trt)-OH como aminoácido C-terminal y Boc-Ala-OH como N-terminal. Se obtuvieron 133,8 mg de péptido puro. LC-MS: $t_R = 6,01$ [gradiente 5-100%B en 8 minutos, flujo: 0,3 ml/min, $\lambda=210-400$ nm]. HRMS: calculado para $C_{75}H_{103}N_{19}O_{19}S_2$: 1637,7119; encontrado 1637,7095.

	HN	H α	H β	H γ	H δ	H ϵ	H ζ	H η
1 Ala	-	3,84	1,24	-	-	-	-	-
2 Gly	8,43	3,71	-	-	-	-	-	-
3 Cys	8,27	4,34	2,80 (β_2) 2,74 (β_3)	-	-	-	-	-
4 Lys	8,35	4,08	1,42	1,10 (γ_2) 1,02 (γ_3)	1,33	2,64	7,25	-
5 Asn	8,10	4,32	2,41	-	7,31 (δ_{21}) 6,69 (δ_{22})	-	-	-
6 Phe	7,84	4,45	2,69 (β_2) 2,54 (β_3)	-	6,74	6,94	6,86	-
7 Phe	8,04	4,29	2,70	-	6,91	7,06	7,01	-
8 DTrp	8,21	4,11	2,74 (β_2) 2,68 (β_3)	-	6,83	9,95 (ϵ_1) 7,28 (ϵ_3)	7,18 (ζ_2) 6,86 (ζ_3)	6,94
9 Lys	7,79	3,72	1,23 (β_2) 0,92 (β_3)	0,23 (γ_2) 0,07 (γ_3)	1,03	2,39 (ϵ_2) 2,34 (ϵ_3)	7,19	-
10 Thr	8,52	3,94	3,87	0,85	-	-	-	-
11 Phe	8,52	4,57	3,09 (β_2) 2,92 (β_3)	-	7,43	8,22	-	-
12 Thr	8,51	4,10	3,89	0,84	-	-	-	-
13 Ser	8,15	4,22	3,58	-	-	-	-	-
14 Cys	8,29	4,41	2,94 (β_2) 2,75 (β_3)	-	-	-	-	-

Desplazamientos químicos en ppm para los protones detectados en espectros TOCSY y NOESY.



Espectro bidimensional homonuclear NOESY 350 ms para [L-4¹Pya6_L-Msa7_D-Trp8]-SST (14). Adquirido en un espectrómetro Bruker Avance III 600 MHz a 285 K.

Restricciones de distancia:

Intrarresidual: 0

Secuenciales: 68

Media distancia (1<dist≤4): 24

Larga distancia (dist>4): 14

Total: 108

Restricción de ángulos diedros: 24

Estadísticas de las veinte mejores estructuras

Energías (kcal/mol):

Energía total: $-255,5 \pm 19,83$

Van der Waals: $12,05 \pm 5,500$

Electrostática: $-490,4 \pm 22,71$

Enlaces: $15,94 \pm 1,078$

Ángulos: $66,16 \pm 3,944$

RMSD*:

Enlaces (Å): $8,412 \times 10^{-3} \pm 2,824 \times 10^{-4}$

Ángulos (°): $1,043 \pm 0,03087$

Impropios (°): $2,421 \pm 0,1766$

Diedros (°): $42,61 \pm 0,3607$

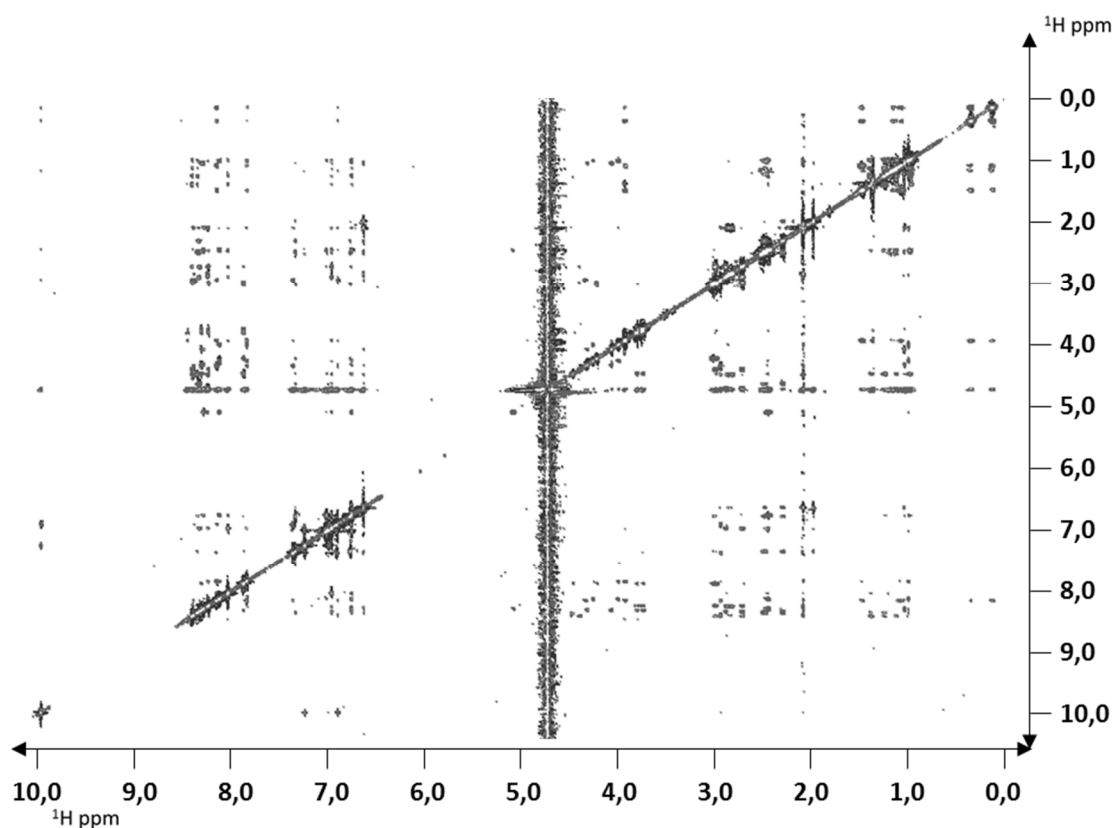
NOEs: $1,225 \times 10^{-2} \pm 4,74 \times 10^{-4}$

Estudio de parámetros de las 20 estructuras con menor energía calculadas para [L-4¹Pya11_D-Trp8]-SST (14). *Desviación media de las 20 estructuras de menor energía respecto a la estructura de menor energía.

[L-4'Pya6_L-Msa7_D-Trp8]-SST (15): El análogo de SST14 **15** fue sintetizado siguiendo el protocolo general de síntesis usando 1,00 g de resina 2-Cl-Trt (1,60 mmol/g), usando Fmoc-Cys(trt)-OH como aminoácido C-terminal y Boc-Ala-OH como N-terminal. Se obtuvieron 16,1 mg de péptido puro. LC-MS: $t_R = 5,54$ [gradiente 5-100%B en 8 minutos, flujo: 0,3 ml/min, $\lambda=210-400$ nm]. HRMS: calculado para $C_{78}H_{109}N_{19}O_{19}S_2$: 1679,7589; encontrado 1679,7567.

	HN	H α	H β	H γ	H δ	H ϵ	H ζ	H η
1 Ala	-	3,89	1,29	-	-	-	-	-
2 Gly	8,49	3,73	-	-	-	-	-	-
3 Cys	8,27	4,37	2,94 (β_2) 2,66 (β_3)	-	-	-	-	-
4 Lys	8,44	4,45	1,31 (β_2) 1,16 (β_3)	1,04 (γ_2) 0,91 (γ_3)	0,93	2,44 (ϵ_2) 2,40 (ϵ_3)	-	-
5 Asn	8,38	4,59	2,43 (β_2) 2,24 (β_3)	-	7,36 (δ_{21}) 6,78 (δ_{22})	-	-	-
6 4'Pya	8,37	4,66	2,83 (β_2) 2,66 (β_3)	-	6,97	8,07	-	-
7 Msa	8,28	4,45	2,80 (β_2) 2,77 (β_3)	-	2,02*	6,64	-	1,94
8 DTrp	8,42	4,31	2,88	-	6,91	10,03 (ϵ_1) 7,38 (ϵ_3)	7,26 (ζ_2) 6,94 (ζ_3)	7,01
9 Lys	8,18	3,89	1,40 (β_2) 1,00 (β_3)	0,26 (γ_2) 0,04 (γ_3)	1,08	2,45 (ϵ_2) 2,38 (ϵ_3)	-	-
10 Thr	7,87	4,22	3,96	0,91	-	-	-	-
11 Phe	8,15	5,06	2,39	-	6,76	7,03	6,99	-
12 Thr	8,32	4,29	4,04	0,96	-	-	-	-
13 Ser	8,34	4,43	3,76 (β_2) 3,70 (β_3)	-	-	-	-	-
14 Cys	7,60	4,19	2,97 (β_2) 2,94 (β_3)	-	-	-	-	-

Desplazamientos químicos en ppm para los protones detectados en espectros TOCSY y NOESY. *Nótese que los H ϕ de la Msa están colocados en la columna de H δ para mayor comodidad visual.



Espectro bidimensional homonuclear NOESY 350 ms para [L-4'Pya6_L-Msa7_D-Trp8]-SST (15). Adquirido en un espectrómetro Bruker Avance III 600 MHz a 285 K.

Restricciones de distancia:

Intrarresidual: 0

Secuenciales: 72

Media distancia ($1 < \text{dist} \leq 4$): 39

Larga distancia ($\text{dist} > 4$): 41

Total: 152

Restricción de ángulos diedros: 20

Estadísticas de las veinte mejores estructuras

Energías (kcal/mol):

Energía total: $-322,6 \pm 22,82$

Van der Waals: $-47,99 \pm 3,954$

Electrostática: $-429,7 \pm 25,13$

Enlaces: $3,225 \pm 0,4392$

Ángulos: $73,3 \pm 2,474$

RMDS*:

Enlaces (Å): $3,705 \times 10^{-3} \pm 2,496 \times 10^{-4}$

Ángulos (°): $1,074 \pm 0,01795$

Impropios (°): $1,352 \pm 0,2045$

Diedros (°): $40,90 \pm 0,4622$

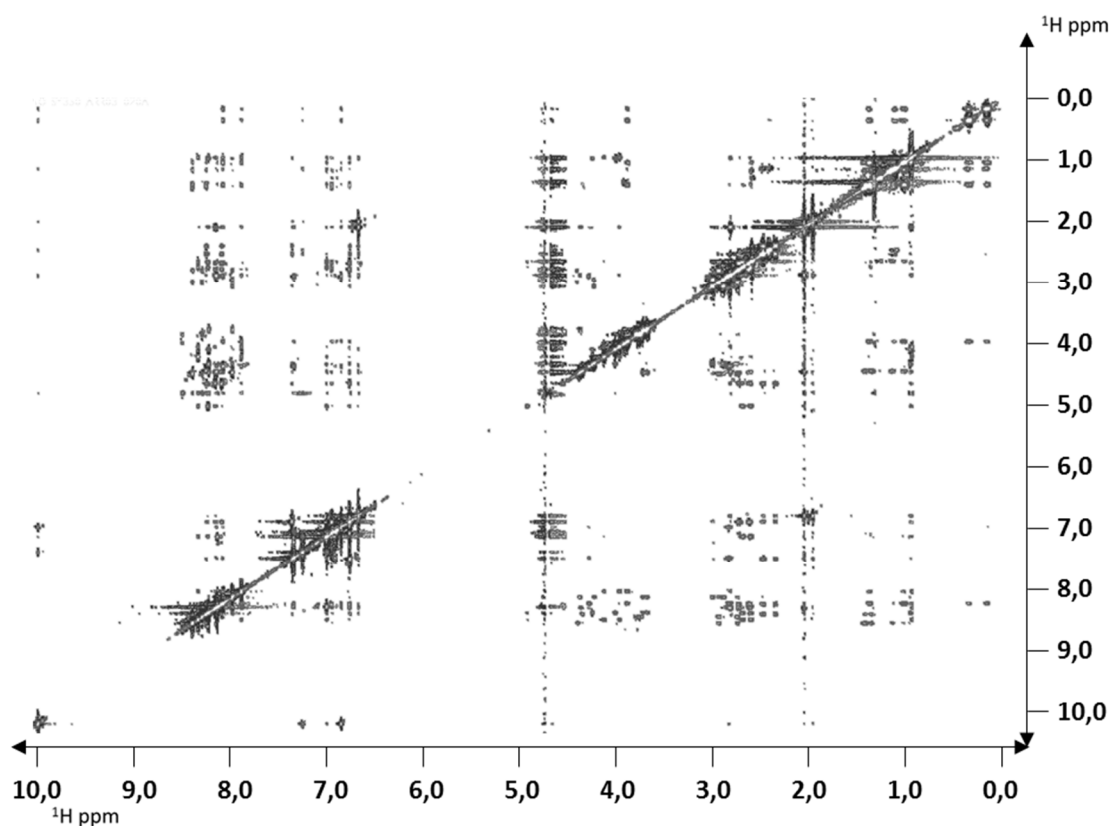
NOEs: $5,159 \times 10^{-3} \pm 6,779 \times 10^{-4}$

Estudio de parámetros de las 20 estructuras con menor energía calculadas para [L-4'Pya6_L-Msa7_D-Trp8]-SST (15). *Desviación media de las 20 estructuras de menor energía respecto a la estructura de menor energía.

[L-4'Pyra11_L-Msa7_D-Trp8]-SST (16): El análogo de SST14 **16** fue sintetizado siguiendo el protocolo general de síntesis usando 1,00 g de resina 2-Cl-Trt (1,60 mmol/g), usando Fmoc-Cys(trt)-OH como aminoácido C-terminal y Boc-Ala-OH como N-terminal. Se obtuvieron 148,3 mg de péptido puro. LC-MS: $t_R = 6,33$ [gradiente 5-100%B en 8 minutos, flujo: 0,3 ml/min, $\lambda=210-400$ nm]. HRMS: calculado para $C_{78}H_{109}N_{19}O_{19}S_2$: 1679,7589; encontrado 1679,7576.

	HN	H α	H β	H γ	H δ	H ϵ	H ζ	H η
1 Ala	-	3,90	1,30	-	-	-	-	-
2 Gly	8,51	3,75	-	-	-	-	-	-
3 Cys	8,30	4,39	2,91 (β_2) 2,72 (β_3)	-	-	-	-	-
4 Lys	8,40	4,34	1,39 (β_2) 1,33 (β_3)	1,11 (γ_2) 0,99 (γ_3)	1,24	2,57	-	-
5 Asn	8,26	4,55	2,45 (β_2) 2,33 (β_3)	-	7,37 (δ_{21}) 6,76 (δ_{22})	-	-	-
6 Phe	8,10	4,54	2,70 (β_2) 2,60 (β_3)	-	6,76	6,95	6,90	-
7 Msa	8,16	4,36	2,90	-	2,02*	6,67	-	1,94
8 DTrp	8,15	4,25	2,82	-	6,85	10,01 (ϵ_1) 7,35 (ϵ_3)	7,25 (ζ_2) 6,92 (ζ_3)	7,00
9 Lys	8,09	3,97	1,35 (β_2) 0,99 (β_3)	0,20 (γ_2) 0,13 (γ_3)	1,09	2,46 (ϵ_2) 2,39 (ϵ_3)	-	-
10 Thr	7,89	4,11	3,95	0,90	-	-	-	-
11 4'Pyra	8,34	4,90	2,67 (β_2) 2,58 (β_3)	-	7,00	8,14	-	-
12 Thr	8,24	4,23	3,99	0,91	-	-	-	-
13 Ser	8,23	4,37	3,67	-	-	-	-	-
14 Cys	7,98	4,22	2,98 (β_2) 2,86 (β_3)	-	-	-	-	-

Desplazamientos químicos en ppm para los protones detectados en espectros TOCSY y NOESY. *Nótese que los H ρ de la Msa están colocados en la columna de H δ para mayor comodidad visual.



Espectro bidimensional homonuclear NOESY 350 ms para [L-4'Pya11_L-Msa7_D-Trp8]-SST (16). Adquirido en un espectrómetro Bruker Avance III 600 MHz a 285 K.

Restricciones de distancia:

Intrarresidual: 0

Secuenciales: 83

Media distancia ($1 < \text{dist} \leq 4$): 55

Larga distancia ($\text{dist} > 4$): 48

Total: 186

Restricción de ángulos diedros: 14

Estadísticas de las veinte mejores estructuras

Energías (kcal/mol):

Energía total: $-380,2 \pm 21,79$

Van der Waals: $-51,96 \pm 2,883$

Electrostática: $-471,4 \pm 25,39$

Enlaces: $2,638 \pm 0,285$

Ángulos: $67,22 \pm 2,114$

RMSD*:

Enlaces (Å): $3,353 \times 10^{-3} \pm 1,815 \times 10^{-4}$

Ángulos (°): $1,029 \pm 0,01605$

Impropios (°): $1,074 \pm 0,1836$

Diedros (°): $40,54 \pm 0,3894$

NOEs: $1,996 \times 10^{-3} \pm 5,072 \times 10^{-4}$

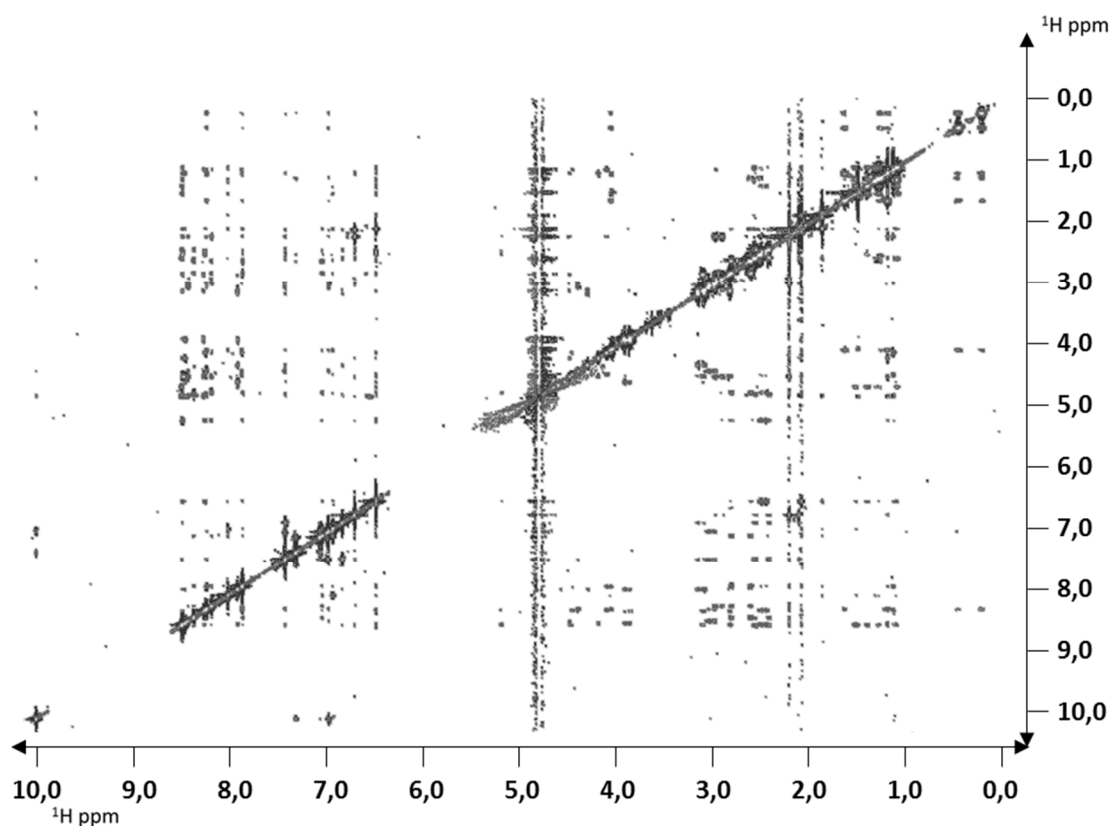
Estudio de parámetros de las 20 estructuras con menor energía calculadas para [L-4'Pya11_L-Msa7_D-Trp8]-SST (16). *Desviación media de las 20 estructuras de menor energía respecto a la estructura de menor energía.

Análogos polisustituídos de la familia de las piridilalaninas.

[L-3'Pya6_L-Msa7_D-Trp8_L-Tmp11]-SST (17): El análogo de SST14 17 fue sintetizado siguiendo el protocolo general de síntesis usando 0,50 g de resina 2-Cl-Trt (1,60 mmol/g), usando Fmoc-Cys(trt)-OH como aminoácido C-terminal y Boc-Ala-OH como N-terminal. Se obtuvieron 8,7 mg de péptido puro. LC-MS: $t_R = 5,80$ [gradiente 5-100% B en 8 minutos, flujo: 0,3 ml/min, $\lambda = 210-400$ nm]. HRMS: calculado para $C_{81}H_{115}N_{19}O_{19}S_2$: 1721,8058; encontrado 1721,8028.

	HN	H α	H β	H γ	H δ	H ϵ	H ζ	H η
1 Ala	-	3,92	1,31	-	-	-	-	-
2 Gly	8,49	3,76	-	-	-	-	-	-
3 Cys	8,27	4,37	2,95 (β_2) 2,67 (β_3)	-	-	-	-	-
4 Lys	8,48	4,53	1,33 (β_2) 1,20 (β_3)	1,09 (γ_2) 0,89 (γ_3)	1,13	2,41	-	-
5 Asn	8,49	4,66	2,40 (β_2) 2,25 (β_3)	-	7,39 (δ_{21}) 6,79 (δ_{22})	-	-	-
6 3'Pya	8,37	4,63	2,65 (β_2) 2,44 (β_3)	-	7,85 (δ_2) 7,00 (δ_1)	6,89	8,01	-
7 Msa	8,17	4,37	2,82 (β_2) 2,75 (β_3)	-	2,03*	6,67	-	1,93
8 DTrp	8,42	4,28	2,89 (β_2) 2,83 (β_3)	-	6,93	10,04 (ϵ_1) 7,40 (ϵ_3)	7,29 (ζ_2) 6,95 (ζ_3)	7,03
9 Lys	8,23	3,94	1,44 (β_2) 1,00 (β_3)	0,23 (γ_2) -0,01 (γ_3)	1,07	2,45 (ϵ_2) 2,34 (ϵ_3)	-	-
10 Thr	7,85	4,35	3,97	0,93	-	-	-	-
11 Tmp	8,25	4,09	2,33 (β_2) 2,29 (β_3)	-	6,43	1,91*	-	1,69
12 Thr	8,47	4,36	4,07	0,99	-	-	-	-
13 Ser	8,45	4,47	3,79 (β_2) 3,74 (β_3)	-	-	-	-	-
14 Cys	7,90	4,18	3,00 (β_2) 2,94 (β_3)	-	-	-	-	-

Desplazamientos químicos en ppm para los protones detectados en espectros TOCSY y NOESY. *Nótese que los H ϕ de la Msa están colocados en la columna de H δ y los de Tmp en la columna de H ϵ para mayor comodidad visual.



Espectro bidimensional homonuclear NOESY 350 ms para [L-3'Pya6_L-Msa7_D-Trp8_L-Tmp11]-SST (17). Adquirido en un espectrómetro Bruker Avance III 600 MHz a 285 K.

Restricciones de distancia:

Intrarresidual: 0

Secuenciales: 90

Media distancia ($1 < \text{dist} \leq 4$): 66

Larga distancia ($\text{dist} > 4$): 47

Total: 203

Restricción de ángulos diedros: 22

Estadísticas de las veinte mejores estructuras

Energías (kcal/mol):

Energía total: $-265,9 \pm 10,34$

Van der Waals: $-43,67 \pm 4,653$

Electrostática: $-426,0 \pm 10,97$

Enlaces: $3,422 \pm 0,5842$

Ángulos: $126,2 \pm 1,663$

RMSD*:

Enlaces (Å): $3,725 \times 10^{-3} \pm 3,118 \times 10^{-4}$

Ángulos (°): $1,376 \pm 0,009047$

Impropios (°): $1,192 \pm 0,2945$

Diedros (°): $40,40 \pm 0,3307$

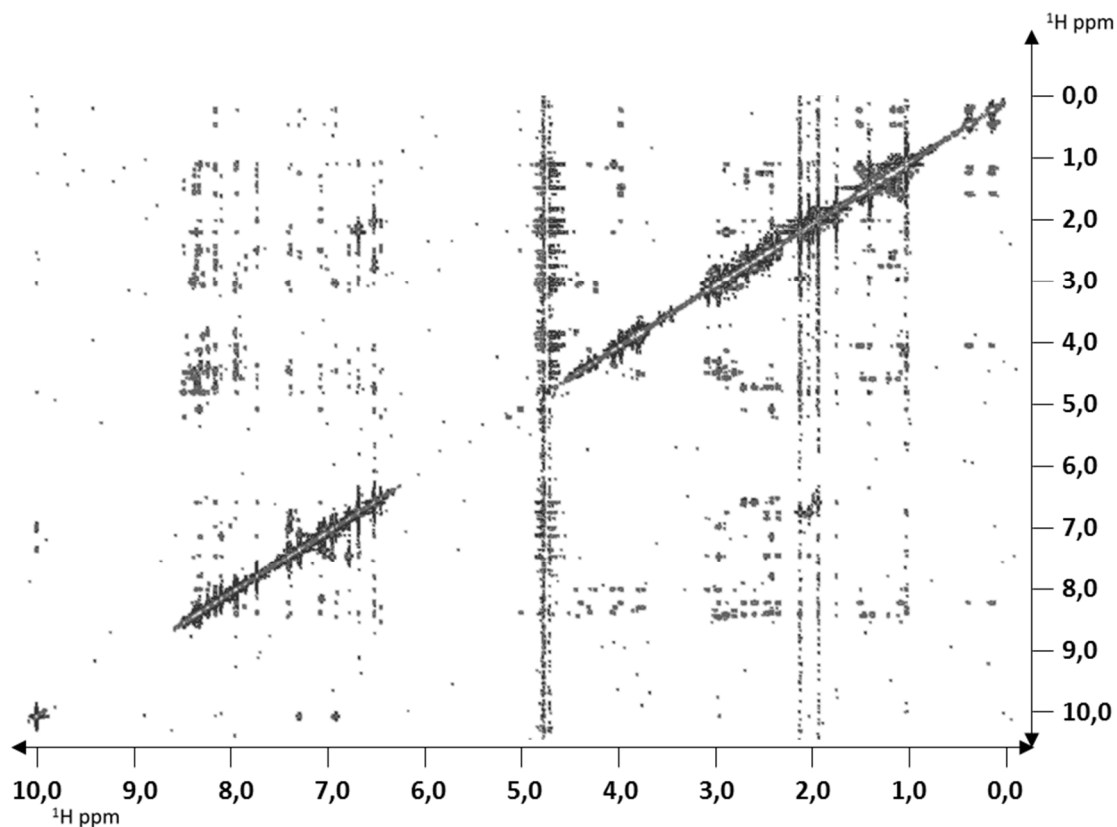
NOEs: $3,487 \times 10^{-3} \pm 3,736 \times 10^{-4}$

Estudio de parámetros de las 20 estructuras con menor energía calculadas para [L-3'Pya6_L-Msa7_D-Trp8_L-Tmp11]-SST (17). *Desviación media de las 20 estructuras de menor energía respecto a la estructura de menor energía.

[L-3'Pya11_L-Msa7_D-Trp8_L-Tmp6]-SST (18): El análogo de SST14 **18** fue sintetizado siguiendo el protocolo general de síntesis usando 1,00 g de resina 2-Cl-Trt (1,60 mmol/g), usando Fmoc-Cys(trt)-OH como aminoácido C-terminal y Boc-Ala-OH como N-terminal. Se obtuvieron 28,1 mg de péptido puro. LC-MS: $t_R = 5,80$ [gradiente 5-100%B en 8 minutos, flujo: 0,3 ml/min, $\lambda=210-400$ nm]. HRMS: calculado para $C_{81}H_{115}N_{19}O_{19}S_2$: 1721,8058; encontrado 1721,8023.

	HN	H α	H β	H γ	H δ	H ϵ	H ζ	H η
1 Ala	-	3,92	1,31	-	-	-	-	-
2 Gly	8,49	3,78	-	-	-	-	-	-
3 Cys	8,29	4,38	2,94 (β_2) 2,74 (β_3)	-	-	-	-	-
4 Lys	8,38	4,47	1,38 (β_2) 1,29 (β_3)	1,12 (γ_2) 1,02 (γ_3)	1,22	2,60	-	-
5 Asn	8,34	4,61	2,39 (β_2) 2,27 (β_3)	-	7,37 (δ_{21}) 6,77 (δ_{22})	-	-	-
6 Tmp	8,16	4,62	2,64 (β_2) 2,53 (β_3)	-	6,50	1,86*	-	1,66
7 Msa	8,36	4,45	2,81	-	2,04*	6,66	-	1,94
8 DTrp	8,40	4,34	2,90	-	6,90	10,03 (ϵ_1) 7,40 (ϵ_3)	7,28 (ζ_2) 6,94 (ζ_3)	7,03
9 Lys	8,16	4,33	1,41 (β_2) 1,00 (β_3)	0,30 (γ_2) 0,04 (γ_3)	1,07	2,46 (ϵ_2) 2,38 (ϵ_3)	-	-
10 Thr	7,94	4,24	4,00	0,94	-	-	-	-
11 3'Pya	8,32	4,96	2,35	-	7,72 (δ_2) 7,07 (δ_1)	7,04	8,10	-
12 Thr	8,33	4,25	3,98	0,93	-	-	-	-
13 Ser	8,24	4,40	3,73 (β_2) 3,70 (β_3)	-	-	-	-	-
14 Cys	7,95	4,18	3,01 (β_2) 2,90 (β_3)	-	-	-	-	-

Desplazamientos químicos en ppm para los protones detectados en espectros TOCSY y NOESY. *Nótese que los H ϕ de la Msa están colocados en la columna de H δ y los de Tmp en la columna de H ϵ para mayor comodidad visual.



Espectro bidimensional homonuclear NOESY 350 ms para [L-3'Pya11_L-Msa7_D-Trp8_L-Tmp6]-SST (**18**). Adquirido en un espectrómetro Bruker Avance III 600 MHz a 285 K.

Restricciones de distancia:

Intrarresidual: 0

Secuenciales: 73

Media distancia ($1 < \text{dist} \leq 4$): 55

Larga distancia ($\text{dist} > 4$): 41

Total: 169

Restricción de ángulos diedros: 22

Estadísticas de las veinte mejores estructuras

Energías (kcal/mol):

Energía total: $-379,0 \pm 14,05$

Van der Waals: $-58,13 \pm 5,096$

Electrostática: $-516,9 \pm 12,16$

Enlaces: $2,513 \pm 0,2394$

Ángulos: $121,1 \pm 1,251$

RMDS*:

Enlaces (Å): $3,212 \times 10^{-3} \pm 1,552 \times 10^{-4}$

Ángulos (°): $1,352 \pm 0,006965$

Impropios (°): $1,102 \pm 0,203$

Diedros (°): $39,78 \pm 0,3104$

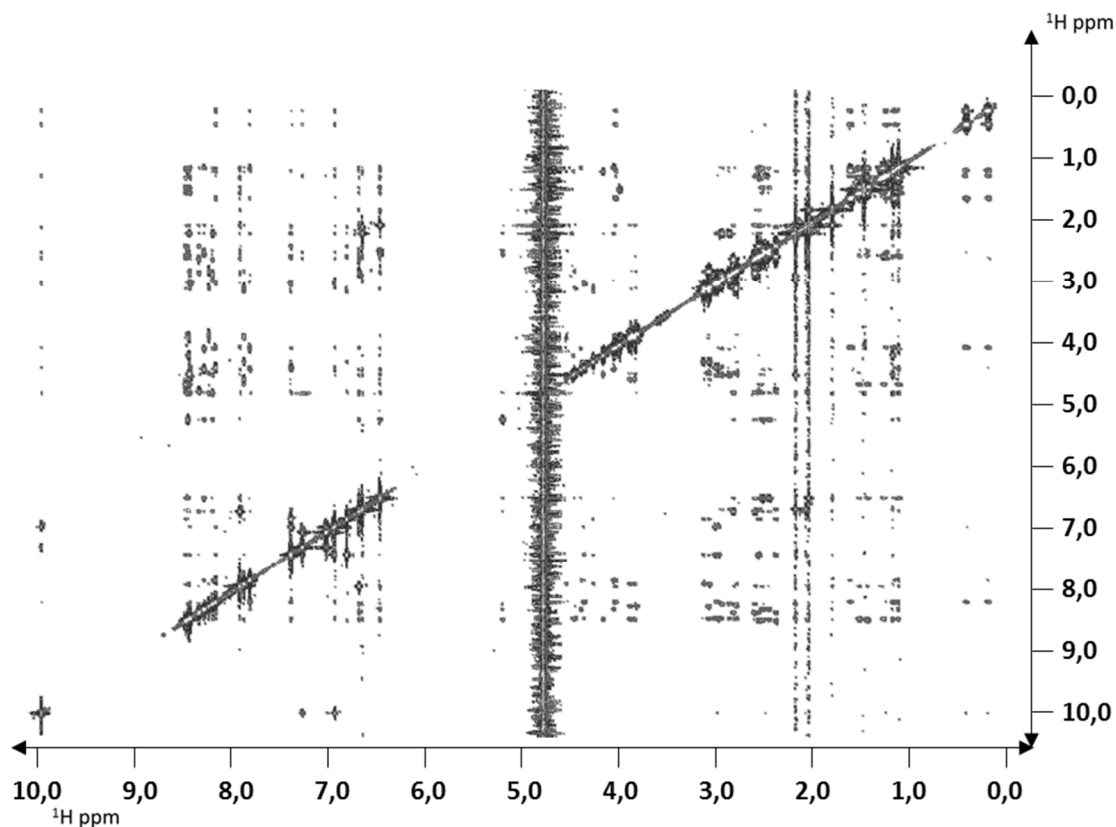
NOEs: $6,031 \times 10^{-4} \pm 2,405 \times 10^{-4}$

Estudio de parámetros de las 20 estructuras con menor energía calculadas para [L-3'Pya11_L-Msa7_D-Trp8_L-Tmp6]-SST (**18**). *Desviación media de las 20 estructuras de menor energía respecto a la estructura de menor energía.

[L-4'Pya6_L-Msa7_D-Trp8_L-Tmp11]-SST (19): El análogo de SST14 **19** fue sintetizado siguiendo el protocolo general de síntesis usando 1,00 g de resina 2-Cl-Trt (1,60 mmol/g), usando Fmoc-Cys(trt)-OH como aminoácido C-terminal y Boc-Ala-OH como N-terminal. Se obtuvieron 12,7 mg de péptido puro. LC-MS: $t_R = 6,00$ [gradiente 5-100%B en 8 minutos, flujo: 0,3 ml/min, $\lambda=210-400$ nm]. HRMS: calculado para $C_{81}H_{115}N_{19}O_{19}S_2$: 1721,8058; encontrado 1721,8053.

	HN	H α	H β	H γ	H δ	H ϵ	H ζ	H η
1 Ala	-	3,90	1,28	-	-	-	-	-
2 Gly	8,45	3,73	-	-	-	-	-	-
3 Cys	8,25	4,36	2,94 (β_2) 2,64 (β_3)	-	-	-	-	-
4 Lys	8,50	4,66	1,34 (β_2) 1,25 (β_3)	1,11 (γ_2) 0,93 (γ_3)	1,08	2,40	-	-
5 Asn	8,49	4,66	2,40 (β_2) 2,22 (β_3)	-	7,88 (δ_{21}) 6,79 (δ_{22})	-	-	-
6 4'Pya	8,36	4,69	2,67 (β_2) 2,45 (β_3)	-	6,66	7,93	-	-
7 Msa	8,22	4,38	2,82 (β_2) 2,70 (β_3)	-	2,01*	6,62	-	1,90
8 DTrp	8,45	4,26	2,85	-	6,91	10,04 (ϵ_1) 7,38 (ϵ_3)	7,26 (ζ_2) 6,92 (ζ_3)	7,00
9 Lys	8,18	3,94	1,42 (β_2) 0,96 (β_3)	0,20 (γ_2) -0,03 (γ_3)	1,06	2,43 (ϵ_2) 2,33 (ϵ_3)	-	-
10 Thr	7,82	4,30	3,95	0,92	-	-	-	-
11 Tmp	8,03	5,13	2,37 (β_2) 2,30 (β_3)	-	6,46	1,86*	-	1,63
12 Thr	8,47	4,38	4,06	0,98	-	-	-	-
13 Ser	8,47	4,46	3,79 (β_2) 3,73 (β_3)	-	-	-	-	-
14 Cys	7,88	4,16	2,99 (β_2) 2,93 (β_3)	-	-	-	-	-

Desplazamientos químicos en ppm para los protones detectados en espectros TOCSY y NOESY. Nótese que los H ϕ de la Msa están colocados en la columna de H δ y los de Tmp en la columna de H ϵ para mayor comodidad visual.



Espectro bidimensional homonuclear NOESY 350 ms para [L-4'Pya6_L-Msa7_D-Trp8_L-Tmp11]-SST (19). Adquirido en un espectrómetro Bruker Avance III 600 MHz a 285 K.

Restricciones de distancia:

Intrarresidual: 0

Secuenciales: 110

Media distancia ($1 < \text{dist} \leq 4$): 80

Larga distancia ($\text{dist} > 4$): 59

Total: 249

Restricción de ángulos diedros: 20

Estadísticas de las veinte mejores estructuras

Energías (kcal/mol):

Energía total: $-337,3 \pm 16,70$

Van der Waals: $-37,95 \pm 5,605$

Electrostática: $-523,9 \pm 17,85$

Enlaces: $4,28 \pm 0,6844$

Ángulos: $129,8 \pm 4,096$

RMSD*:

Enlaces (Å): $4,184 \times 10^{-3} \pm 3,360 \times 10^{-4}$

Ángulos (°): $1,400 \pm 0,02186$

Impropios (°): $1,738 \pm 0,2731$

Diedros (°): $41,18 \pm 0,5627$

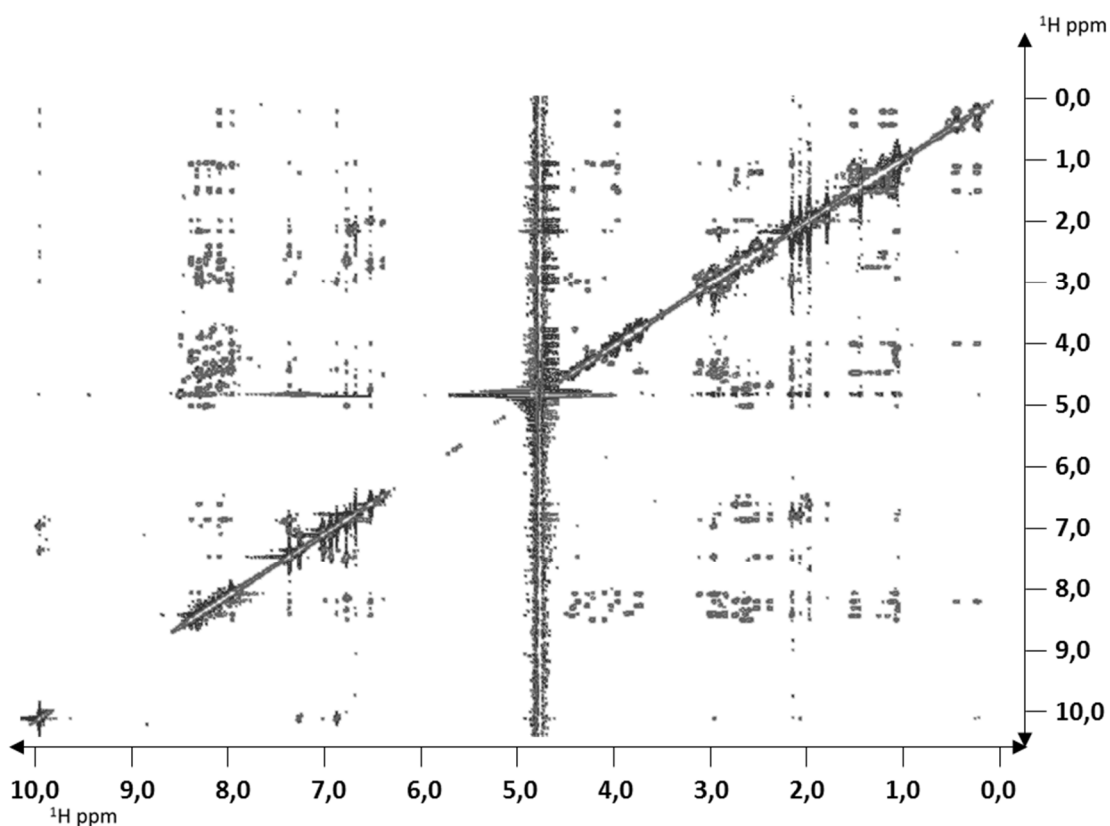
NOEs: $3,576 \times 10^{-3} \pm 4,687 \times 10^{-4}$

Estudio de parámetros de las 20 estructuras con menor energía calculadas para [L-4'Pya6_L-Msa7_D-Trp8_L-Tmp11]-SST (19). *Desviación media de las 20 estructuras de menor energía respecto a la estructura de menor energía.

[L-4'Pya11_L-Msa7_D-Trp8_L-Tmp6]-SST (20): El análogo de SST14 **20** fue sintetizado siguiendo el protocolo general de síntesis usando 1,00 g de resina 2-Cl-Trt (1,60 mmol/g), usando Fmoc-Cys(trt)-OH como aminoácido C-terminal y Boc-Ala-OH como N-terminal. Se obtuvieron 37,3 mg de péptido puro. LC-MS: $t_R = 7,20$ [gradiente 5-100%B en 8 minutos, flujo: 0,3 ml/min, $\lambda=210-400$ nm]. HRMS: calculado para $C_{81}H_{115}N_{19}O_{19}S_2$: 1721,8058; encontrado 1721,8047.

	HN	H α	H β	H γ	H δ	H ϵ	H ζ	H η
1 Ala	-	3,91	1,30	-	-	-	-	-
2 Gly	8,52	3,75	-	-	-	-	-	-
3 Cys	8,29	4,36	2,88 (β_2) 2,74 (β_3)	-	-	-	-	-
4 Lys	8,38	4,35	1,37 (β_2) 1,33 (β_3)	1,11 (γ_2) 1,01 (γ_3)	1,19	2,61	-	-
5 Asn	8,21	4,55	2,40 (β_2) 2,25 (β_3)	-	7,36 (δ_{21}) 6,76 (δ_{22})	-	-	-
6 Tmp	8,09	4,62	2,62 (β_2) 2,51 (β_3)	-	6,50	1,85*	-	1,65
7 Msa	8,32	4,42	2,80	-	2,02*	6,65	-	1,94
8 DTrp	8,30	4,30	2,85	-	6,86	10,01 (ϵ_1) 7,36 (ϵ_3)	7,25 (ζ_2) 6,92 (ζ_3)	7,00
9 Lys	8,10	3,87	1,36 (β_2) 0,96 (β_3)	0,28 (γ_2) 0,06 (γ_3)	1,06	2,43 (ϵ_2) 2,38 (ϵ_3)	-	-
10 Thr	7,99	4,14	4,02	0,92	-	-	-	-
11 4'Pya	8,40	4,89	2,54 (β_2) 2,48 (β_3)	-	6,75	8,05	-	-
12 Thr	8,25	4,20	3,94	0,90	-	-	-	-
13 Ser	8,17	4,33	3,64	-	-	-	-	-
14 Cys	7,98	4,19	3,00 (β_2) 2,85 (β_3)	-	-	-	-	-

Desplazamientos químicos en ppm para los protones detectados en espectros TOCSY y NOESY. Nótese que los H ϕ de la Msa están colocados en la columna de H δ y los de Tmp en la columna de H ϵ para mayor comodidad visual.



Espectro bidimensional homonuclear NOESY 350 ms para [L-4'Pya11_L-Msa7_D-Trp8_L-Tmp6]-SST (20). Adquirido en un espectrómetro Bruker Avance III 600 MHz a 285 K.

Restricciones de distancia:

Intrarresidual: 0

Secuenciales: 84

Media distancia ($1 < \text{dist} \leq 4$): 50

Larga distancia ($\text{dist} > 4$): 44

Total: 178

Restricción de ángulos diedros: 22

Estadísticas de las veinte mejores estructuras

Energías (kcal/mol):

Energía total: $-179,0 \pm 10,94$

Van der Waals: $-24,86 \pm 5,751$

Electrostática: $-414,6 \pm 18,26$

Enlaces: $5,288 \pm 0,744$

Ángulos: $147,6 \pm 3,936$

RMSD*:

Enlaces (Å): $4,635 \times 10^{-3} \pm 3,243 \times 10^{-4}$

Ángulos (°): $1,487 \pm 0,01982$

Impropios (°): $2,601 \pm 0,1833$

Diedros (°): $41,43 \pm 0,2174$

NOEs: $3,856 \times 10^{-3} \pm 8,897 \times 10^{-4}$

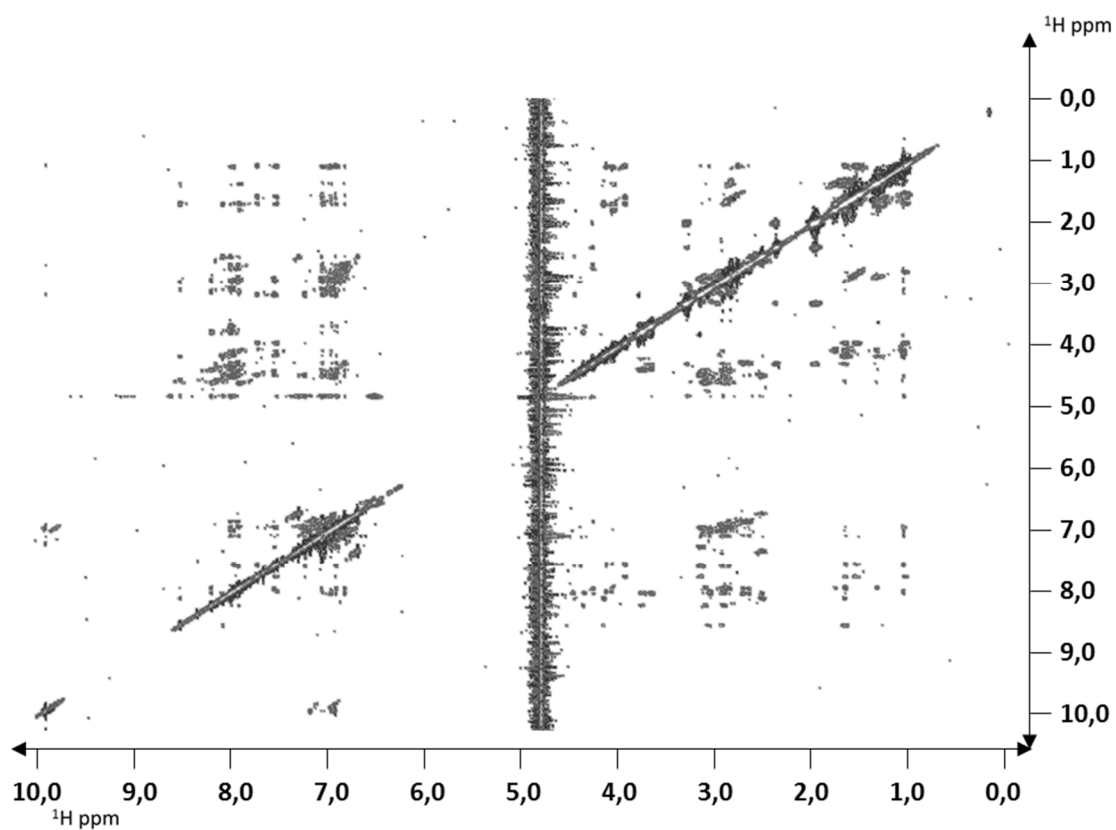
Estudio de parámetros de las 20 estructuras con menor energía calculadas para [L-4'Pya11_L-Msa7_D-Trp8_L-Tmp6]-SST (20). *Desviación media de las 20 estructuras de menor energía respecto a la estructura de menor energía.

9.2.6. Análogos de cortistatina (CST14).

rCST14 (21): La cortistatina murina **21** fue sintetizada siguiendo el protocolo general de síntesis usando 0,25 g de resina 2-Cl-Trt (1,60 mmol/g), usando Fmoc-Lys(boc)-OH como aminoácido C-terminal y Boc-P o-OH como N-terminal. Se obtuvieron 12,8 mg de crudo. ESI-MS: calculada para 1777,1 g/mol, encontrada (m/z): $[M+2H]^+/2=889,3$, $[M+3H]^+/3=593,1$.

	HN	H α	H β	H γ	H δ	H ϵ	H ζ	H η
1 Pro	7,95	4,15	2,18 (β 2) 1,77 (β 3)	1,76	3,14	-	-	-
2 Cys	8,67	4,43	2,90 (β 2) 2,77 (β 3)	-	-	-	-	-
3 Lys	8,56	4,04	1,45	1,12 (γ 2) 1,06 (γ 3)	1,39	2,68	-	-
4 Asn	8,11	4,38	2,34	-	7,29 (δ 21) 6,66 (δ 22)	-	-	-
5 Phe	8,03	4,14	2,53 (β 2) 2,47 (β 3)	-	6,80	7,03	6,96	-
6 Phe	7,95	4,28	2,76 (β 2) 2,69 (β 3)	-	6,89	7,05	-	-
7 Trp	7,56	4,34	2,99	-	6,90	10,01 (ϵ 1) 7,23 (ϵ 3)	7,17 (ζ 2) 6,88 (ζ 3)	6,96
8 Lys	7,74	3,80	1,44 (β 2) 1,34 (β 3)	0,80	1,28	2,60	-	-
9 Thr	7,53	4,00	3,94	0,82	-	-	-	-
10 Phe	7,99	4,36	2,89 (β 2) 2,75 (β 3)	-	6,95	7,05	-	-
11 Ser	8,03	4,23	3,53	-	-	-	-	-
12 Ser	8,02	4,26	3,63 (β 2) 3,60 (β 3)	-	-	-	-	-
13 Cys	8,23	4,47	2,94 (β 2) 2,74 (β 3)	-	-	-	-	-
14 Lys	7,94	3,94	1,55 (β 2) 1,44 (β 3)	1,10	1,36	2,66	-	-

Desplazamientos químicos en ppm para los protones detectados en espectros TOCSY y NOESY.

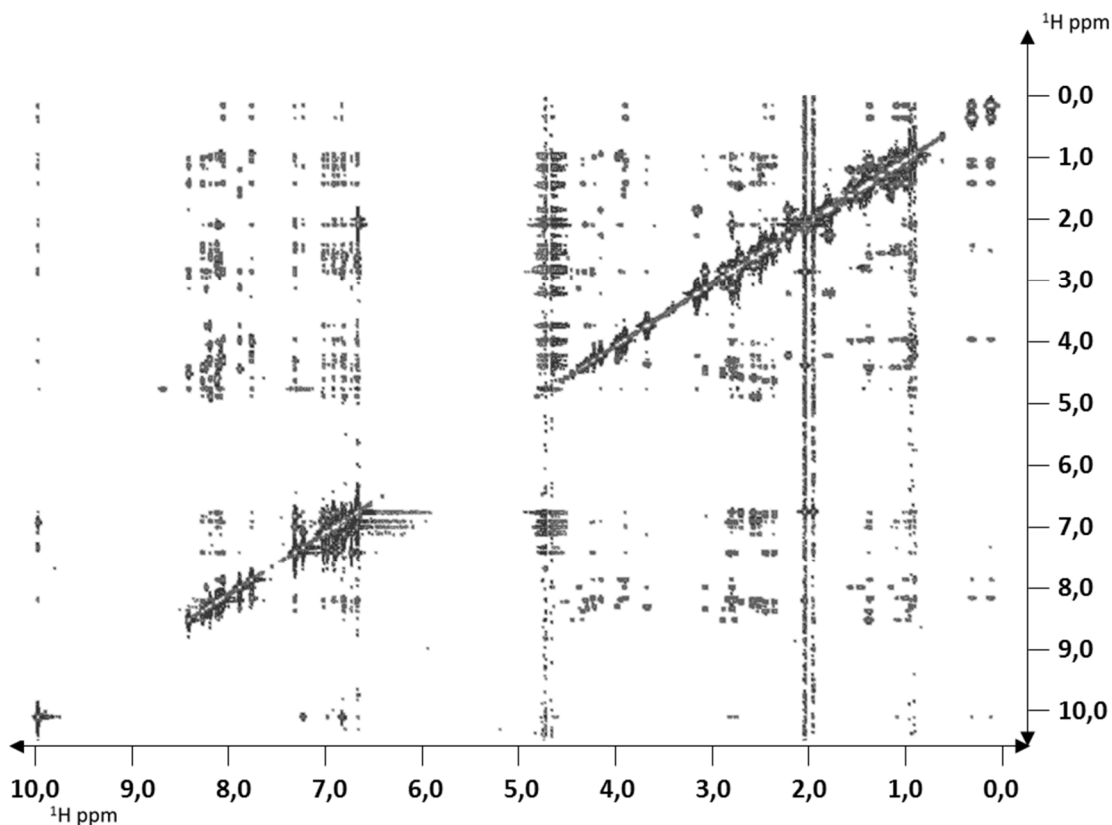


Espectro bidimensional homonuclear NOESY 350 ms para rCST14 (**21**). Adquirido en un espectrómetro Bruker Avance III 600 MHz a 285 K.

[L-Msa6_D-Trp7_L-Thr11]-CST14 (22): El análogo de rCST14 **22** fue sintetizado siguiendo el protocolo general de síntesis usando 0,25 g de resina 2-Cl-Trt (1,60 mmol/g), usando Fmoc-Lys(boc)-OH como aminoácido C-terminal y Boc-Pro-OH como N-terminal. Se obtuvieron 0,56 mg de crudo. ESI-MS: calculada para 1777,1 g/mol, encontrada (m/z): [M+2H]⁺/2=889,3, [M+3H]⁺/3=593,1.

	HN	H α	H β	H γ	H δ	H ϵ	H ζ	H η
1 Pro	-	4,16	2,21 (β 2) 2,19 (β 3)	1,81 (γ 2) 1,77 (γ 3)	3,17 (δ 2) 3,14 (δ 3)	-	-	-
2 Cys	8,71	4,45	2,88 (β 2) 2,76 (β 3)	-	-	-	-	-
3 Lys	8,44	4,35	1,36	1,07 (γ 2) 0,97 (γ 3)	1,23 (δ 2) 1,13 (δ 3)	2,49	-	-
4 Asn	8,30	4,56	2,44 (β 2) 2,35 (β 3)	-	7,33 (δ 21) 6,75 (δ 22)	-	-	-
5 Phe	8,03	4,14	2,53 (β 2) 2,47 (β 3)	-	6,70	6,94	6,89	-
6 Msa	8,14	4,31	2,79	-	2,03*	6,68	-	1,74
7 DTrp	8,12	4,24	2,82 (β 2) 2,75 (β 3)	-	6,85	10,01 (ϵ 1) 7,33 (ϵ 3)	7,25 (ζ 2) 6,91 (ζ 3)	7,00
8 Lys	8,10	3,90	1,35 (β 2) 0,99 (β 3)	0,29 (γ 2) 0,10 (γ 3)	1,28	2,45 (ϵ 2) 2,37 (ϵ 3)	-	-
9 Thr	7,79	4,16	3,94	0,89	-	-	-	-
10 Phe	8,11	4,82	2,57 (β 2) 2,51 (β 3)	-	6,83	7,04	6,99	-
11 Thr	8,22	4,22	3,98	0,93	-	-	-	-
12 Ser	8,22	4,30	3,67	-	-	-	-	-
13 Cys	8,26	4,38	3,66 (β 2) 2,79 (β 3)	-	-	-	-	-
14 Lys	7,91	3,91	1,56 (β 2) 1,45 (β 3)	1,13	1,41	2,72	-	-

Desplazamientos químicos en ppm para los protones detectados en espectros TOCSY y NOESY. *Nótese que los H ρ de la Msa están colocados en la columna de H δ para mayor comodidad visual.



Espectro bidimensional homonuclear NOESY 350 ms para [L-Msa6_D-Trp7_L-Thr11]-CST14 (22). Adquirido en un espectrómetro Bruker Avance III 600 MHz a 285 K.

Restricciones de distancia:

Intrarresidual: 0
 Secuenciales: 92
 Media distancia ($1 < \text{dist} \leq 4$): 52
 Larga distancia ($\text{dist} > 4$): 56
 Total: 200
 Restricción de ángulos diedros: 24

Estadísticas de las veinte mejores estructuras

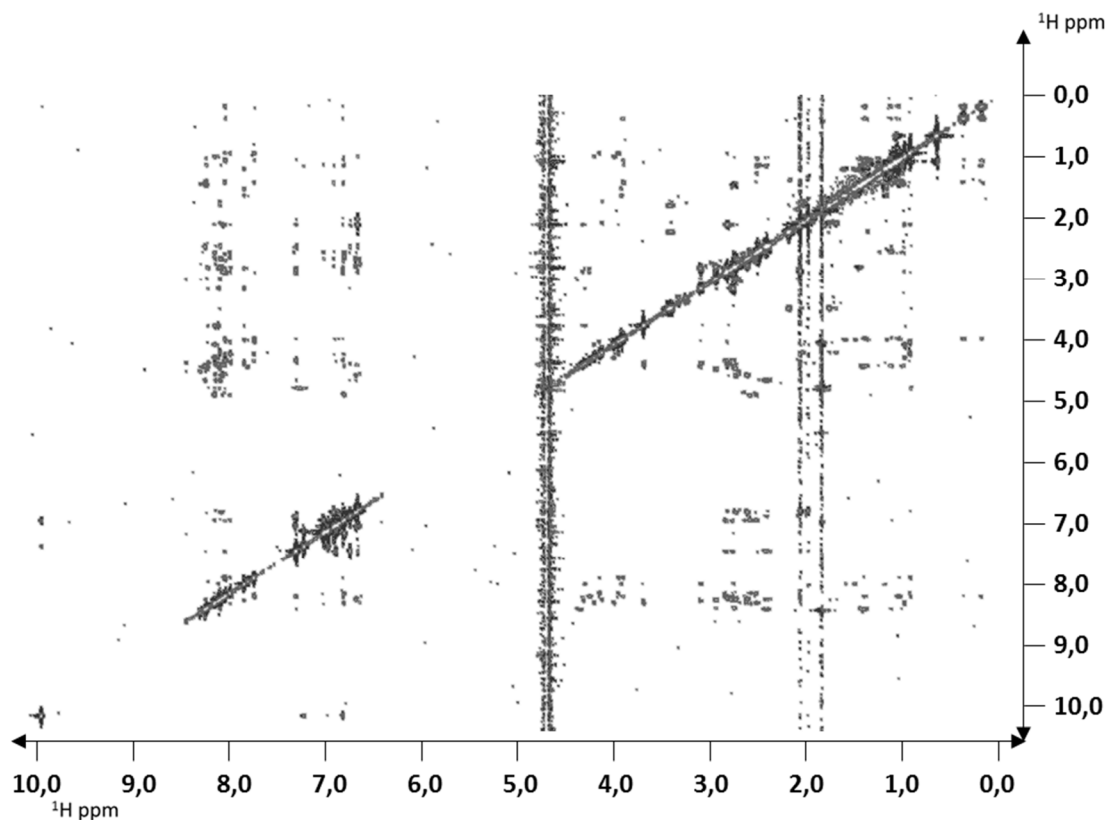
Energías (kcal/mol):	RMSD*:
Energía total: $26,09 \pm 20,49$	Enlaces (Å): $1,000 \times 10^{-2} \pm 4,043 \times 10^{-4}$
Van der Waals: $106,8 \pm 8,184$	Ángulos (°): $1,806 \pm 0,04618$
Electrostática: $-495,3 \pm 30,44$	Impropios (°): $2,617 \pm 0,2759$
Enlaces: $25,56 \pm 2,125$	Diedros (°): $43,14 \pm 0,1599$
Ángulos: $229,0 \pm 12,07$	NOEs: $1,196 \times 10^{-2} \pm 4,760 \times 10^{-4}$

Estudio de parámetros de las 20 estructuras con menor energía calculadas para [L-Msa6_D-Trp7_L-Thr11]-CST14 (22). *Desviación media de las 20 estructuras de menor energía respecto a la estructura de menor energía.

Octanoil-[L-Msa6_D-Trp7_L-Thr11]-CST14 (23): El análogo de rCST14 **23** fue sintetizado siguiendo el protocolo general de síntesis usando 0,25 g de resina 2-Cl-Trt (1,60 mmol/g), usando Fmoc-Lys(boc)-OH como aminoácido C-terminal y Fmoc-Pro-OH como N-terminal. Se introdujo el ácido octanoico con 5 eq. de ácido, 5 eq. de HOBT y 5 eq. de DIPCDI, obteniéndose 0,50 g de crudo. ESI-MS: calculada para 1903,35 g/mol, encontrada (m/z): $[M+2H]^+/2=952,4$, $[M+3H]^+/2=635,2$.

	HN	H α	H β	H γ	H δ	H ϵ	H ζ	H η
1 Pro	-	4,12	2,01 (β 2) 1,72 (β 3)	1,67 (γ 2) 1,65 (γ 3)	3,42 (δ 2) 3,38 (δ 3)	-	-	-
2 Cys	8,13	4,38	2,92 (β 2) 2,73 (β 3)	-	-	-	-	-
3 Lys	8,28	4,34	1,39 (β 2) 1,07 (β 3)	1,34 (γ 2) 1,20 (γ 3)	0,97	2,49	-	-
4 Asn	8,29	4,56	2,39	-	7,33 (δ 21) 6,76 (δ 22)	-	-	-
5 Phe	8,13	4,49	2,71 (β 2) 2,59 (β 3)	-	6,70	6,93	6,89	-
6 Msa	8,11	4,32	2,80	-	2,03*	6,68	-	1,95
7 DTrp	8,08	4,25	2,81 (β 2) 2,75 (β 3)	-	6,84	10,01 (ϵ 1) 7,33 (ϵ 3)	7,25 (ζ 2) 6,92 (ζ 3)	7,00
8 Lys	8,08	3,90	1,34 (β 2) 1,00 (β 3)	0,31 (γ 2) 0,12 (γ 3)	1,08	2,46 (ϵ 2) 2,38 (ϵ 3)	-	-
9 Thr	7,78	4,14	3,94	0,87	-	-	-	-
10 Phe	8,03	4,80	2,56 (β 2) 2,49 (β 3)	-	6,83	7,04	7,00	-
11 Thr	8,19	4,20	3,98	0,93	-	-	-	-
12 Ser	8,18	4,31	3,68	-	-	-	-	-
13 Cys	8,15	4,29	3,08 (β 2) 2,74 (β 3)	-	-	-	-	-
14 Lys	7,88	3,91	1,56 (β 2) 1,45 (β 3)	1,13	1,41	2,73	-	-

Desplazamientos químicos en ppm para los protones detectados en espectros TOCSY y NOESY. *Nótese que los H ρ de la Msa están colocados en la columna de H δ para mayor comodidad visual.



Espectro bidimensional homonuclear NOESY 350 ms para octanoil-[L-Msa6_D-Trp7_L-Thr11]-CST14 (**23**). Adquirido en un espectrómetro Bruker Avance III 600 MHz a 285 K.

Restricciones de distancia:

Intrarresidual: 0

Secuenciales: 65

Media distancia ($1 < \text{dist} \leq 4$): 21

Larga distancia ($\text{dist} > 4$): 21

Total: 107

Restricción de ángulos diedros: 0

Estadísticas de las veinte mejores estructuras

Energías (kcal/mol):

Energía total: $-273,3 \pm 18,53$

Van der Waals: $-22,48 \pm 10,92$

Electrostática: $-452,4 \pm 33,94$

Enlaces: $4,008 \pm 0,5717$

Ángulos: $103,9 \pm 6,411$

RMDS*:

Enlaces (Å): $3,955 \times 10^{-3} \pm 2,771 \times 10^{-4}$

Ángulos (°): $1,216 \pm 0,03701$

Impropios (°): $1,43 \pm 0,344$

Diedros (°): $42,03 \pm 1,021$

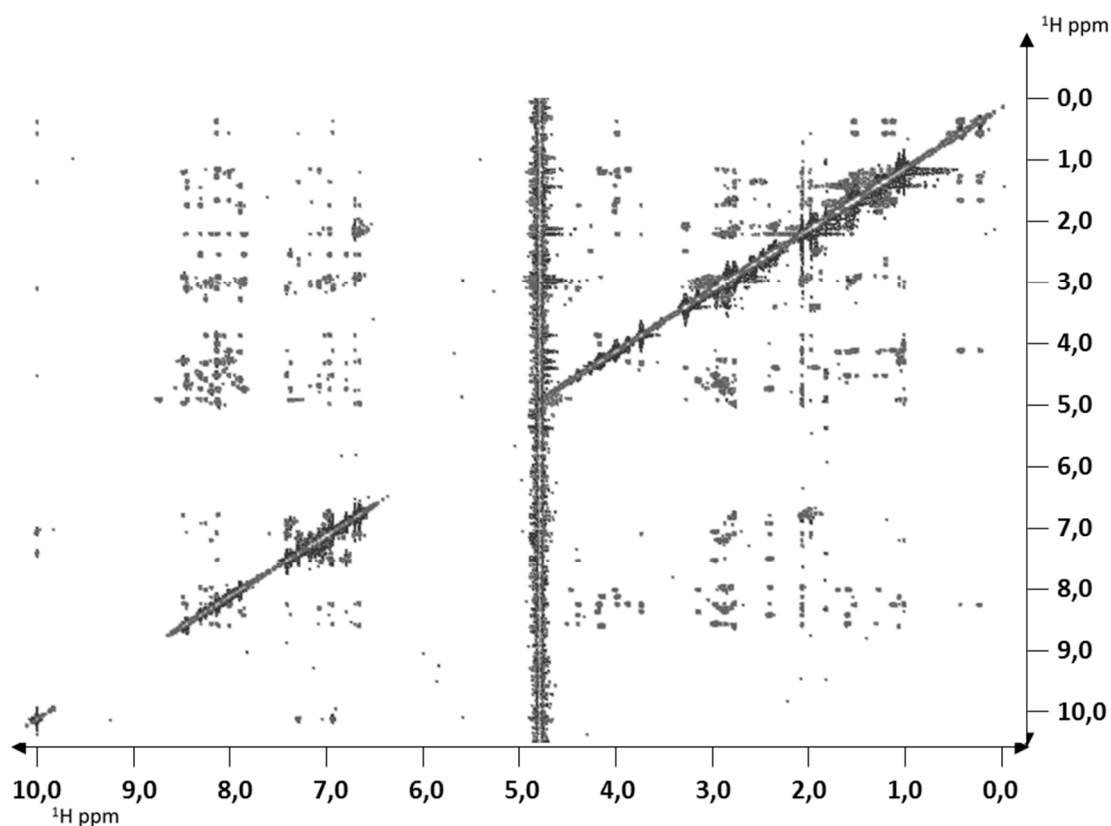
NOEs: $6,337 \times 10^{-3} \pm 1,179 \times 10^{-3}$

Estudio de parámetros de las 20 estructuras con menor energía calculadas para octanoil-[L-Msa6_D-Trp7_L-Thr11]-CST14 (**23**). *Desviación media de las 20 estructuras de menor energía respecto a la estructura de menor energía.

[L-Msa5_D-Trp7_L-Thr11]-CST14 (24): El análogo de rCST14 **24** fue sintetizado siguiendo el protocolo general de síntesis usando 0,25 g de resina 2-Cl-Trt (1,60 mmol/g), usando Fmoc-Lys(boc)-OH como aminoácido C-terminal y Boc-Pro-OH como N-terminal. Se obtuvieron 0,53 mg de crudo. ESI-MS: calculada para 1777,15 g/mol, encontrada (m/z): [M+2H]⁺/2=889,3 [M+3H]⁺/2= 593,1.

	HN	H α	H β	H γ	H δ	H ϵ	H ζ	H η
1 Pro	7,74	4,16	2,21	1,81 (γ 2) 1,78 (γ 3)	3,17 (δ 2) 3,14 (δ 3)	-	-	-
2 Cys	8,00	4,41	2,92 (β 2) 2,75 (β 3)	-	-	-	-	-
3 Lys	8,42	4,30	1,45	1,16 (γ 2) 1,05 (γ 3)	1,35	2,64	-	-
4 Asn	8,27	4,51	2,27	-	7,33 (δ 21) 6,74 (δ 22)	-	-	-
5 Msa	7,82	4,56	2,77 (β 2) 2,68 (β 3)	-	1,93*	6,65	-	1,84
6 Phe	8,16	4,46	2,79 (β 2) 2,74 (β 3)	-	7,03	7,12	7,07	-
7 DTrp	8,42	4,29	2,84	-	6,88	10,00 (ϵ 1) 7,36 (ϵ 3)	7,24 (ζ 2) 6,90 (ζ 3)	6,99
8 Lys	8,11	3,87	1,37 (β 2) 0,97 (β 3)	0,25 (γ 2) 0,06 (γ 3)	1,06	2,43 (ϵ 2) 2,34 (ϵ 3)	-	-
9 Thr	7,97	4,05	4,03	0,90	-	-	-	-
10 Phe	8,46	4,76	2,64	-	6,60	6,91	6,97	-
11 Thr	8,08	4,06	3,76	0,85	-	-	-	-
12 Ser	8,11	4,08	3,62	-	-	-	-	-
13 Cys	8,22	4,36	3,02 (β 2) 2,74 (β 3)	-	-	-	-	-
14 Lys	7,86	3,91	1,55 (β 2) 1,44 (β 3)	1,12	1,40	2,71	-	-

Desplazamientos químicos en ppm para los protones detectados en espectros TOCSY y NOESY. Nótese que los H ϕ de la Msa están colocados en la columna de H δ para mayor comodidad visual.



Espectro bidimensional homonuclear NOESY 350 ms para [L-Msa5_D-Trp7_L-Thr11]-CST14 (24). Adquirido en un espectrómetro Bruker Avance III 600 MHz a 285 K.

Restricciones de distancia:

Intrarresidual: 0

Secuenciales: 78

Media distancia ($1 < \text{dist} \leq 4$): 37

Larga distancia ($\text{dist} > 4$): 50

Total: 165

Restricción de ángulos diedros: 20

Estadísticas de las veinte mejores estructuras

Energías (kcal/mol):

Energía total: $-77,74 \pm 18,24$

Van der Waals: $1,073 \pm 7,874$

Electrostática: $-404,2 \pm 17,43$

Enlaces: $10,06 \pm 0,8831$

Ángulos: $128,3 \pm 7,282$

RMSD*:

Enlaces (Å): $6,250 \times 10^{-3} \pm 2,751 \times 10^{-4}$

Ángulos (°): $1,347 \pm 0,03784$

Impropios (°): $4,179 \pm 0,2102$

Diedros (°): $43,4 \pm 0,5269$

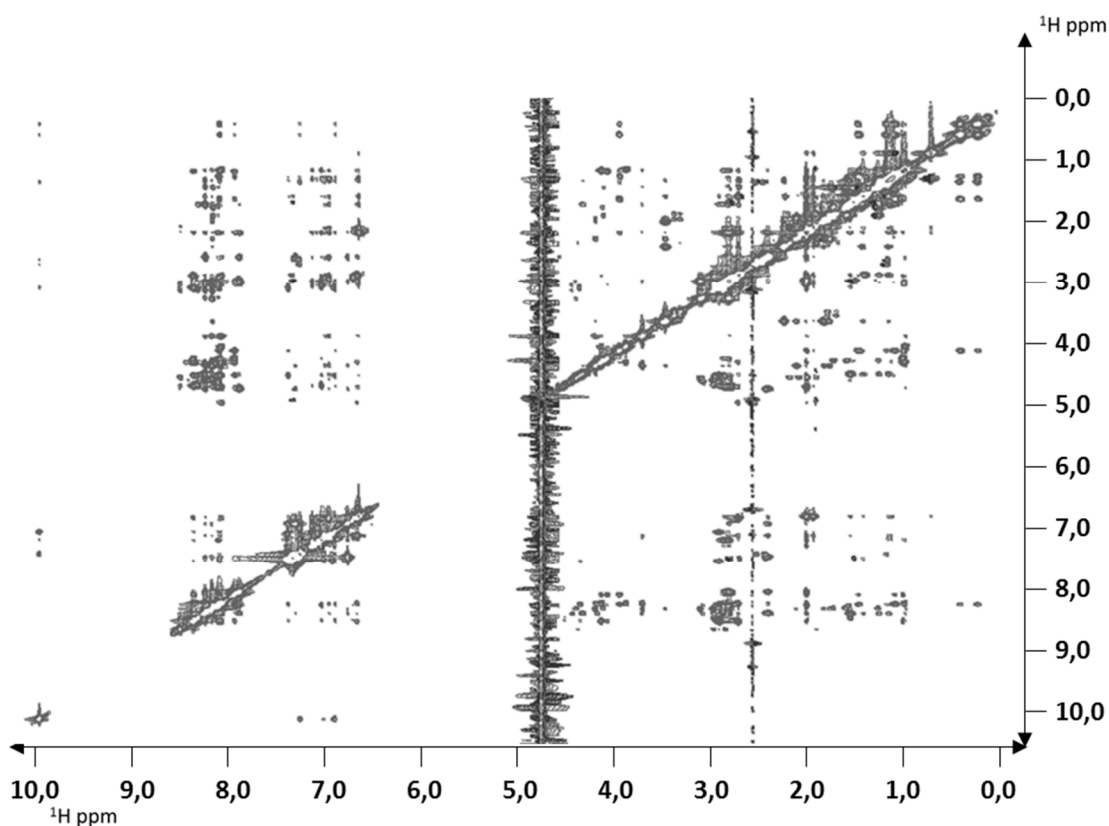
NOEs: $7,625 \times 10^{-3} \pm 5,385 \times 10^{-4}$

Estudio de parámetros de las 20 estructuras con menor energía calculadas para [L-Msa5_D-Trp7_L-Thr11]-CST14 (24). *Desviación media de las 20 estructuras de menor energía respecto a la estructura de menor energía.

Octanoil-[L-Msa5_D-Trp7_L-Thr11]-CST14 (25): El análogo de rCST14 **25** fue sintetizado siguiendo el protocolo general de síntesis usando 0,25 g de resina 2-Cl-Trt (1,60 mmol/g), usando Fmoc-Lys(boc)-OH como aminoácido C-terminal y Fmoc-Pro-OH como N-terminal. Se introdujo el ácido octanoico con 5 eq. de ácido, 5 eq. de HOBt y 5 eq. de DIPCDI, obteniéndose 0,55 g de crudo. ESI-MS: calculada para 1903,35 g/mol, encontrada (m/z): $[M+2H]^+/2=952,4$, $[M+3H]^+/2=635,2$

	HN	H α	H β	H γ	H δ	H ϵ	H ζ	H η
1 Pro	-	4,12	2,13 (β 2) 1,72 (β 3)	1,66	3,38	-	-	-
2 Cys	8,15	4,37	2,88 (β 2) 2,78 (β 3)	-	-	-	-	-
3 Lys	8,23	4,26	1,44	1,14 (γ 2) 1,04 (γ 3)	1,30	2,61	7,31	-
4 Asn	8,23	4,56	2,31	-	7,28 (δ 21) 6,73 (δ 22)	-	-	-
5 Msa	7,88	4,55	2,72	-	1,90*	6,61	-	1,82
6 Phe	8,16	4,46	2,75	-	7,01	7,10	7,06	-
7 DTrp	8,35	4,27	2,83	-	6,86	9,97 (ϵ 1) 7,35 (ϵ 3)	7,23 (ζ 2) 6,91 (ζ 3)	6,98
8 Lys	8,08	3,87	1,35 (β 2) 0,94 (β 3)	0,28 (γ 2) 0,10 (γ 3)	1,07	2,45 (ϵ 2) 2,35 (ϵ 3)	7,23	-
9 Thr	7,92	4,06	4,00	0,89	-	-	-	-
10 Phe	8,36	4,29	2,62	-	6,63	6,93	6,67	-
11 Thr	8,05	4,06	3,80	0,85	-	-	-	-
12 Ser	8,07	4,11	3,63	-	-	-	-	-
13 Cys	8,16	4,33	3,01 (β 2) 2,72 (β 3)	-	-	-	-	-
14 Lys	8,15	4,03	1,49	1,41 (γ 2) 1,16 (γ 3)	1,63	2,72	-	-

Desplazamientos químicos en ppm para los protones detectados en espectros TOCSY y NOESY. *Nótese que los H ρ de la Msa están colocados en la columna de H δ para mayor comodidad visual.



Espectro bidimensional homonuclear NOESY 350 ms para octanoil-[L-Msa5_D-Trp7_L-Thr11]-CST14 (**25**). Adquirido en un espectrómetro Bruker Avance III 600 MHz a 285 K.

Restricciones de distancia:

Intrarresidual: 0
 Secuenciales: 93
 Media distancia ($1 < \text{dist} \leq 4$): 31
 Larga distancia ($\text{dist} > 4$): 49
 Total: 173
 Restricción de ángulos diedros: 24

Estadísticas de las veinte mejores estructuras

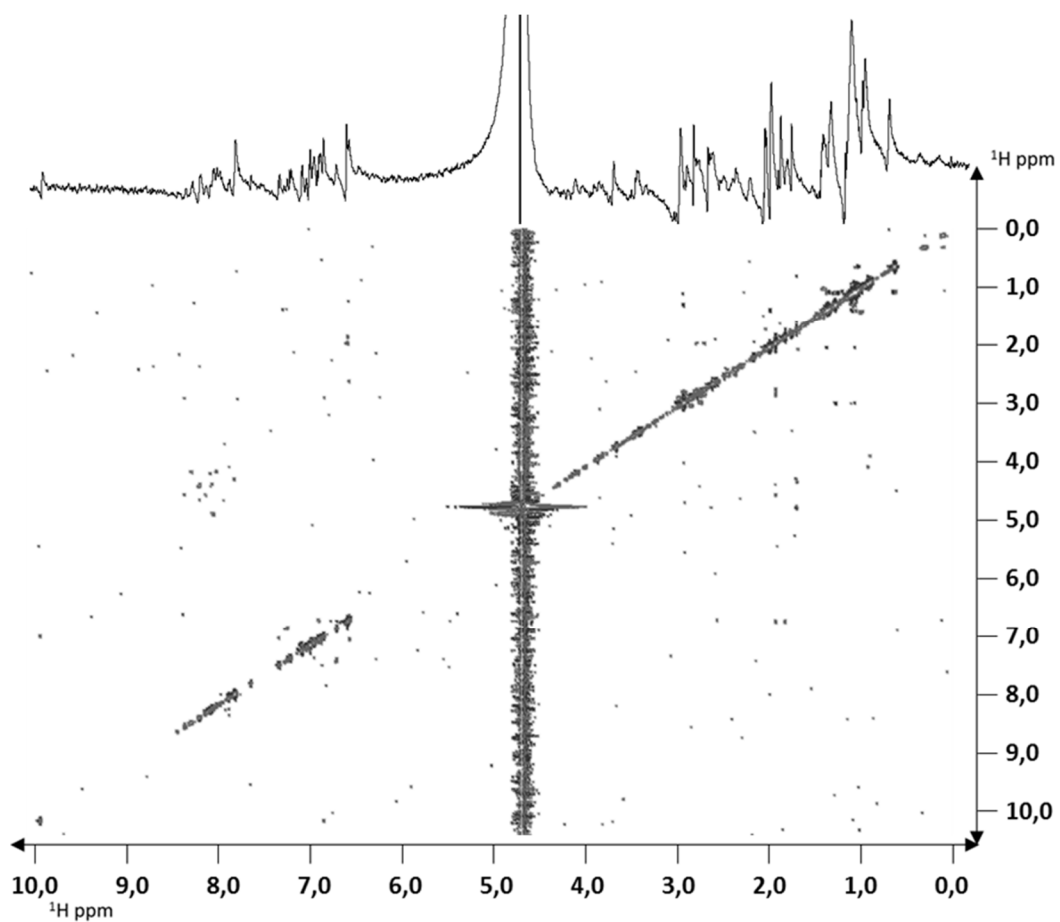
Energías (kcal/mol):	RMSD*:
Energía total: $12,64 \pm 24,44$	Enlaces (Å): $8,722 \times 10^{-3} \pm 4,603 \times 10^{-4}$
Van der Waals: $73,87 \pm 12,69$	Ángulos (°): $1,543 \pm 0,04689$
Electrostática : $-424,0 \pm 28,05$	Impropios (°): $3,284 \pm 0,2722$
Enlaces: $19,45 \pm 2,025$	Diedros (°): $40,96 \pm 0,2467$
Ángulos: $167,3 \pm 10,22$	NOEs: $1,123 \times 10^{-2} \pm 7,214 \times 10^{-4}$

Estudio de parámetros de las 20 estructuras con menor energía calculadas para octanoil-[L-Msa5_D-Trp7_L-Thr11]-CST14 (**25**). *Desviación media de las 20 estructuras de menor energía respecto a la estructura de menor energía.

Octanoil-[L-Msa5_D-Trp7_L-Thr11]-CST13 (26): El análogo de rCST14 **26** fue sintetizado siguiendo el protocolo general de síntesis usando 0,25 g de resina 2-Cl-Trt (1,60 mmol/g), usando Fmoc-Cys(trt)-OH como aminoácido C-terminal y Fmoc-Pro-OH como N-terminal. Se introdujo el ácido octanoico con 5 eq. de ácido, 5 eq. de HOBT y 5 eq. de DIPCDI, obteniéndose 0,53 g de crudo. ESI-MS: calculada para 1775,18 g/mol, encontrada (m/z): $[M+2H]^+/2=888,6$, $[M+3H]^+/3=592,7$.

	HN	H α	H β	H γ	H δ	H ϵ	H ζ	H η
1 Pro	-	4,11	2,01	1,73 (γ 2) 1,66 (γ 3)	3,40	-	-	-
2 Cys	8,40	4,29	2,85	-	-	-	-	-
3 Lys	8,25	4,30	1,43	1,15 (γ 2) 1,02 (γ 3)	1,29 (δ 2) 1,22 (δ 3)	2,58	-	-
4 Asn	8,24	4,55	2,30	-	7,27 (δ 21) 6,73 (δ 22)	-	-	-
5 Msa	8,18	4,47	2,79 (β 2) 2,69 (β 3)	-	1,91*	6,62	-	1,80
6 Phe	8,18	4,47	2,79 (β 2) 2,73 (β 3)	-	7,03	7,11	7,07	-
7 DTrp	7,86	4,16	2,84	-	6,88	9,99 (ϵ 1) 7,36 (ϵ 3)	7,24 (ζ 2) 6,90 (ζ 3)	6,99
8 Lys	7,85	2,91	1,25	1,03	1,34	1,98	-	-
9 Thr	7,93	4,09	4,00	0,89	-	-	-	-
10 Phe	8,33	4,09	2,55	-	6,59	6,93	6,90	-
11 Thr	8,09	4,08	3,88	0,97	-	-	-	-
12 Ser	8,06	4,08	3,65	-	-	-	-	-
13 Cys	8,12	4,34	2,91 (β 2) 2,73 (β 3)	-	-	-	-	-

Desplazamientos químicos en ppm para los protones detectados en espectros TOCSY y NOESY. *Nótese que los H ρ de la Msa están colocados en la columna de H δ para mayor comodidad visual.



Espectro bidimensional homonuclear NOESY 350 ms para octanoil-[L-Msa5_D-Trp7_L-Thr11]-CST13 (26). La densidad de señales es extremadamente baja. Adquirido en un espectrómetro Bruker Avance III 600 MHz a 285 K.

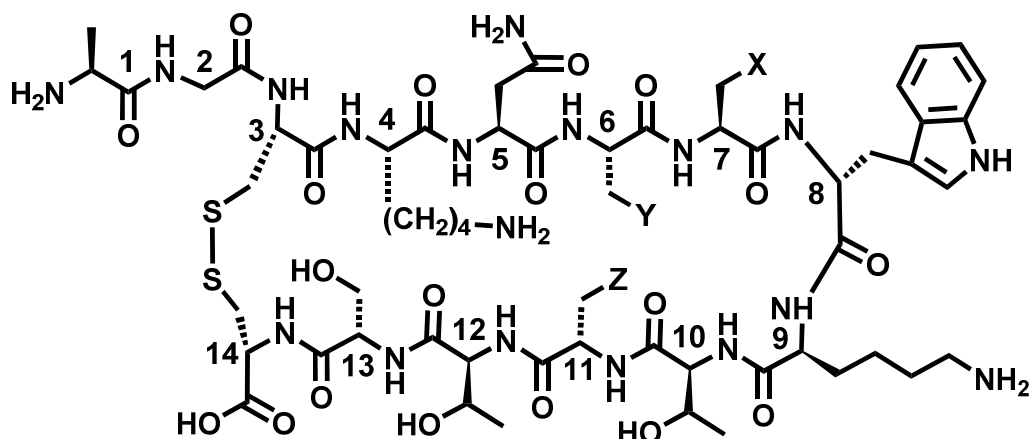
Anexo I.

Observaciones finales.

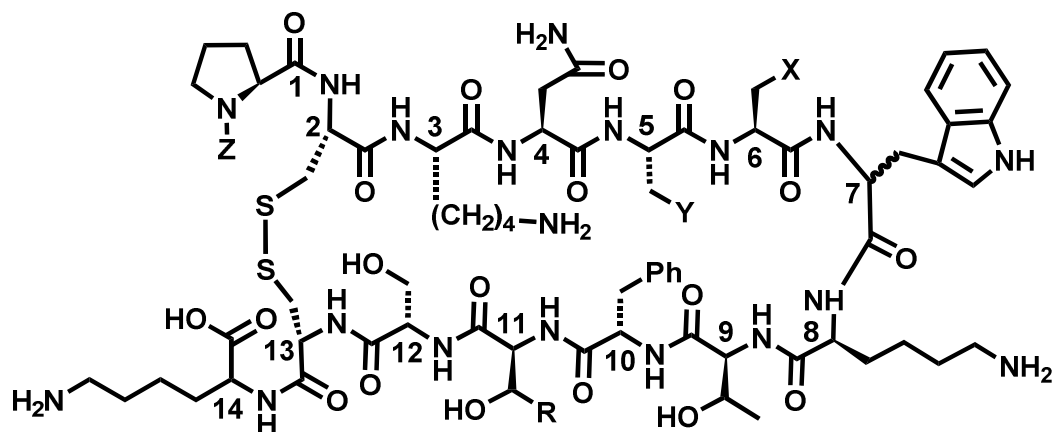
En el momento de finalización de la presente tesis doctoral, el capítulo III (correspondiente a los derivados de la familia de la L- β -3',5'-difluorofenilalanina) y el capítulo VII (sobre los análogos de cortistatina) se encontraban en fases previas de publicación, teniendo el primero el título provisional de *Peptide Aromatic Interactions Modulated by Fluorinated residues: Synthesis, structure and biological activity of somatostatin analogs containing (3,5-difluorophenyl)-alanine*.

Anexo II.

Lista de péptidos.



Familia de la Dfp
[L-Dfp6_D-Trp8]-SST (1)
[L-Dfp7_D-Trp8]-SST (2)
[L-Dfp11_D-Trp8]-SST (3)
[L-Dfp6_L-Msa7_D-Trp8]-SST (4)
[L-Dfp11_L-Msa7_D-Trp8]-SST (5)
[L-Dfp6,11_L-Msa7_D-Trp8]-SST (6)
Familia de la 3'Pya
[L-3'Pya6_D-Trp8]-SST (7)
[L-3'Pya7_D-Trp8]-SST (8)
[L-3'Pya11_D-Trp8]-SST (9)
[L-3'Pya6_L-Msa7_D-Trp8]-SST (10)
[L-3'Pya11_L-Msa7_D-Trp8]-SST (11)
Familia de la 4'Pya
[L-4'Pya6_D-Trp8]-SST (12)
[L-4'Pya7_D-Trp8]-SST (13)
[L-4'Pya11_D-Trp8]-SST (14)
[L-4'Pya6_L-Msa7_D-Trp8]-SST (15)
[L-4'Pya11_L-Msa7_D-Trp8]-SST (16)
Familia de las piridilalaninas polisustituidas
[L-3'Pya6_L-Msa7_D-Trp8_L-Tmp11]-SST (17)
[L-3'Pya11_L-Msa7_D-Trp8_L-Tmp6]-SST (18)
[L-4'Pya6_L-Msa7_D-Trp8_L-Tmp11]-SST (19)
[L-4'Pya11_L-Msa7_D-Trp8_L-Tmp6]-SST (20)

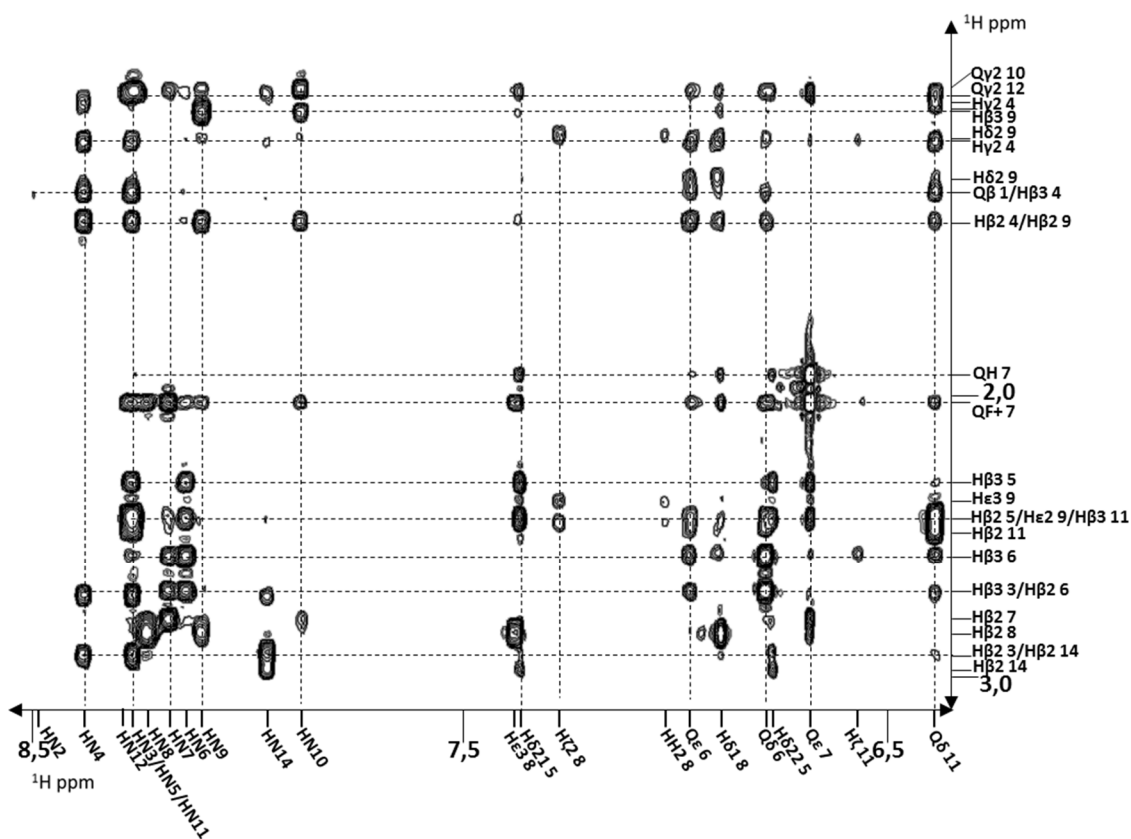


Familia de la cortistatina
rCST14 (21)
[L-Msa6_D-Trp7_L-Thr11]-CST14 (22)
octanoil-[L-Msa6_D-Trp7_L-Thr11]-CST14 (23)
[L-Msa5_D-Trp7_L-Thr11]-CST14 (24)
octanoil-[L-Msa5_D-Trp7_L-Thr11]-CST14 (25)
octanoil-[L-Msa5_D-Trp7_L-Thr11]-CST13 (26)

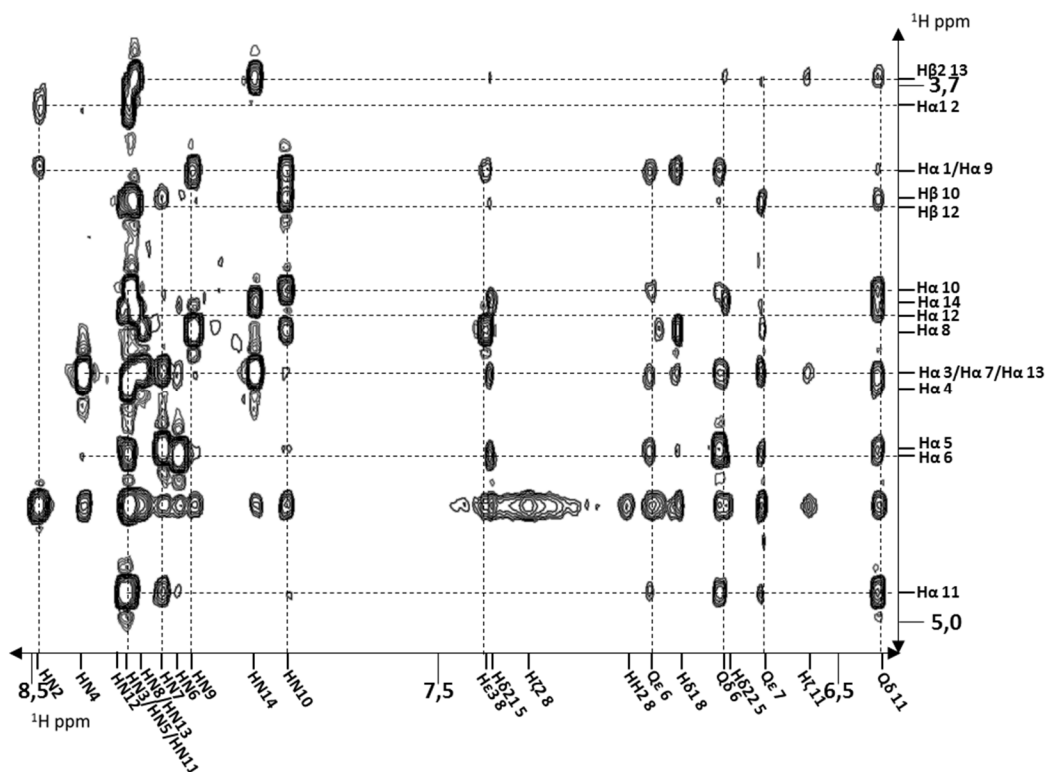
Anexo III.

**Ejemplos seleccionados de
asignación ^1H - ^1H .**

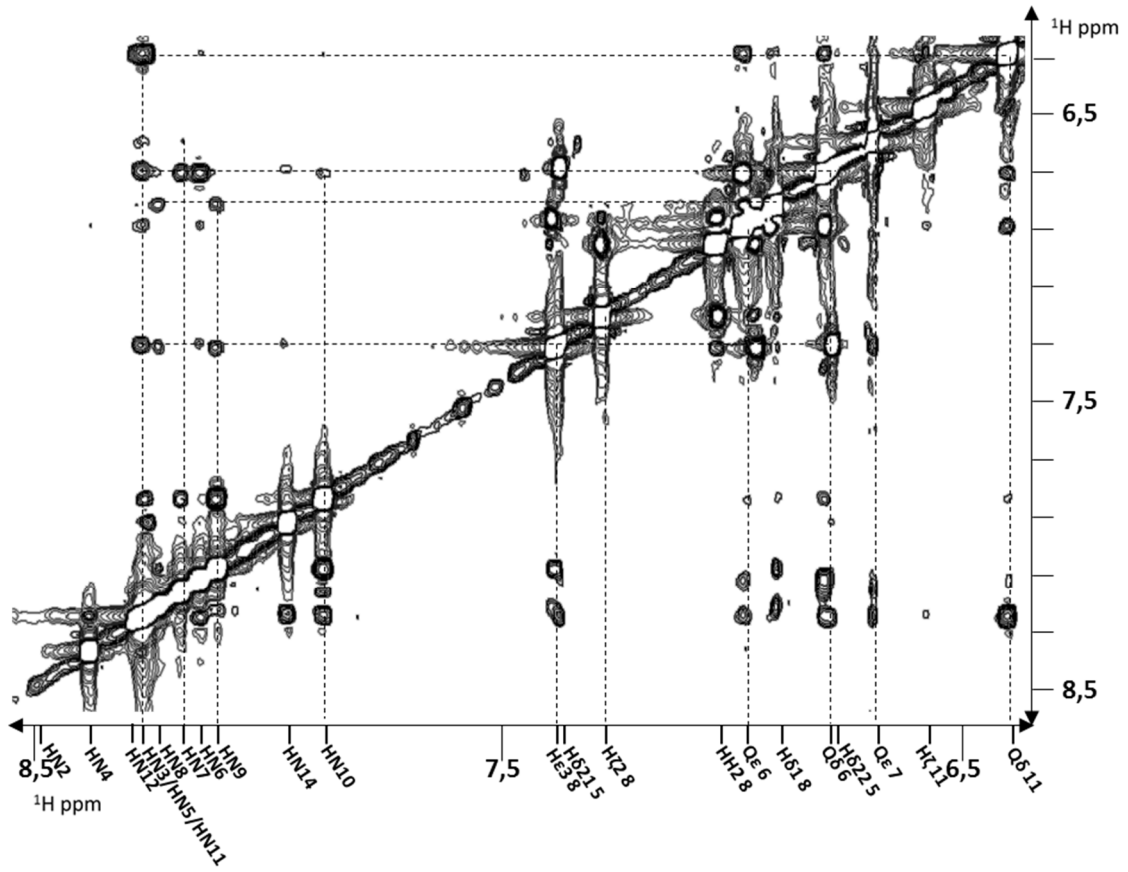
[L-Dfp11_L-Msa7_D-Trp8]-SST (5)



Espectro bidimensional homonuclear NOESY 350 ms para [L-Dfp11_L-Msa7_D-Trp8]-SST (5). Ampliación del cuadrante superior izquierda.

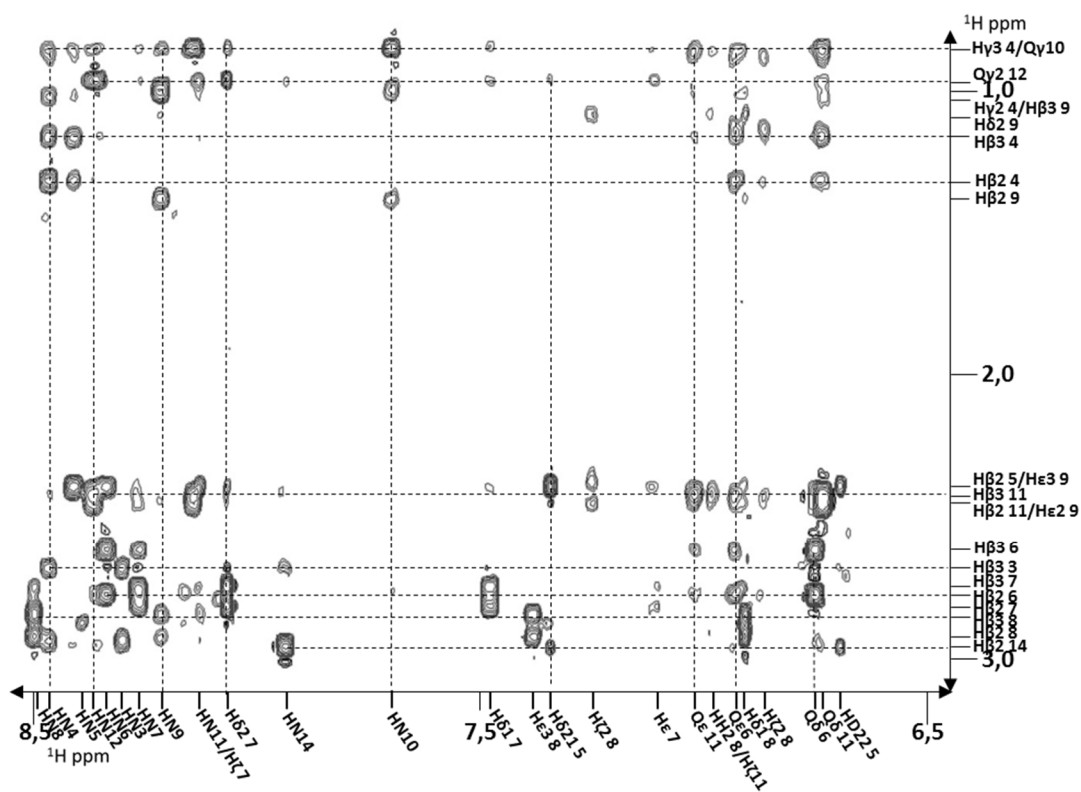


Espectro bidimensional homonuclear NOESY 350 ms para [L-Dfp11_L-Msa7_D-Trp8]-SST (5). Ampliación del cuadrante central izquierda.

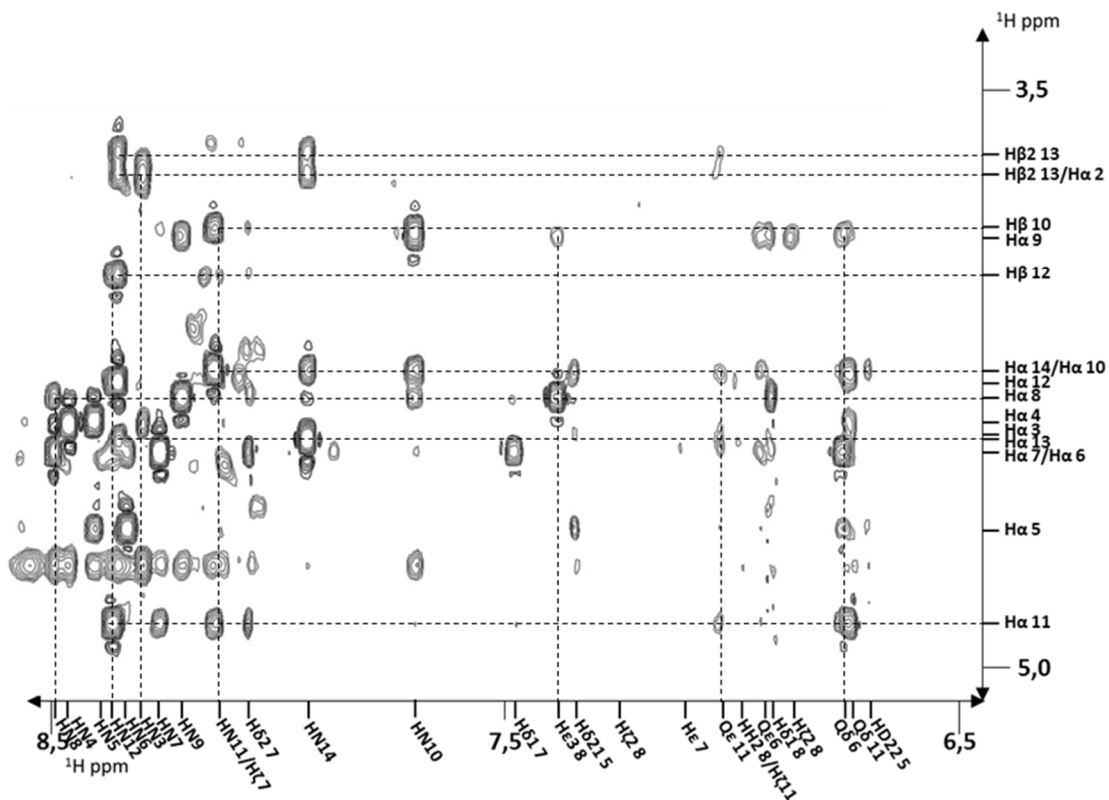


Espectro bidimensional homonuclear NOESY 350 ms para [L-Dfp11_L-Msa7_D-Trp8]-SST (5). Ampliación del cuadrante inferior izquierda.

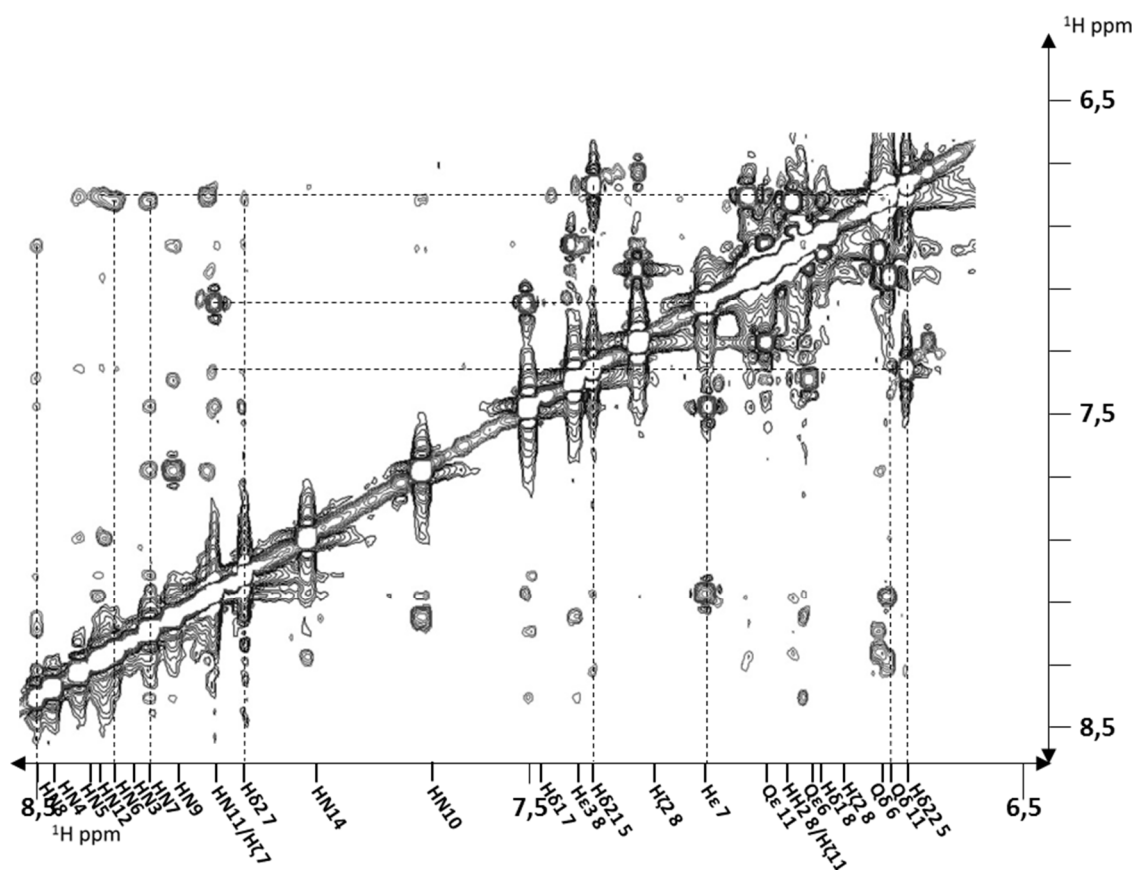
[L-3'Pya7_D-Trp8]-SST (8)



Espectro bidimensional homonuclear NOESY 350 ms para [L-3'Pya7_D-Trp8]-SST (8). Ampliación del cuadrante superior izquierda.

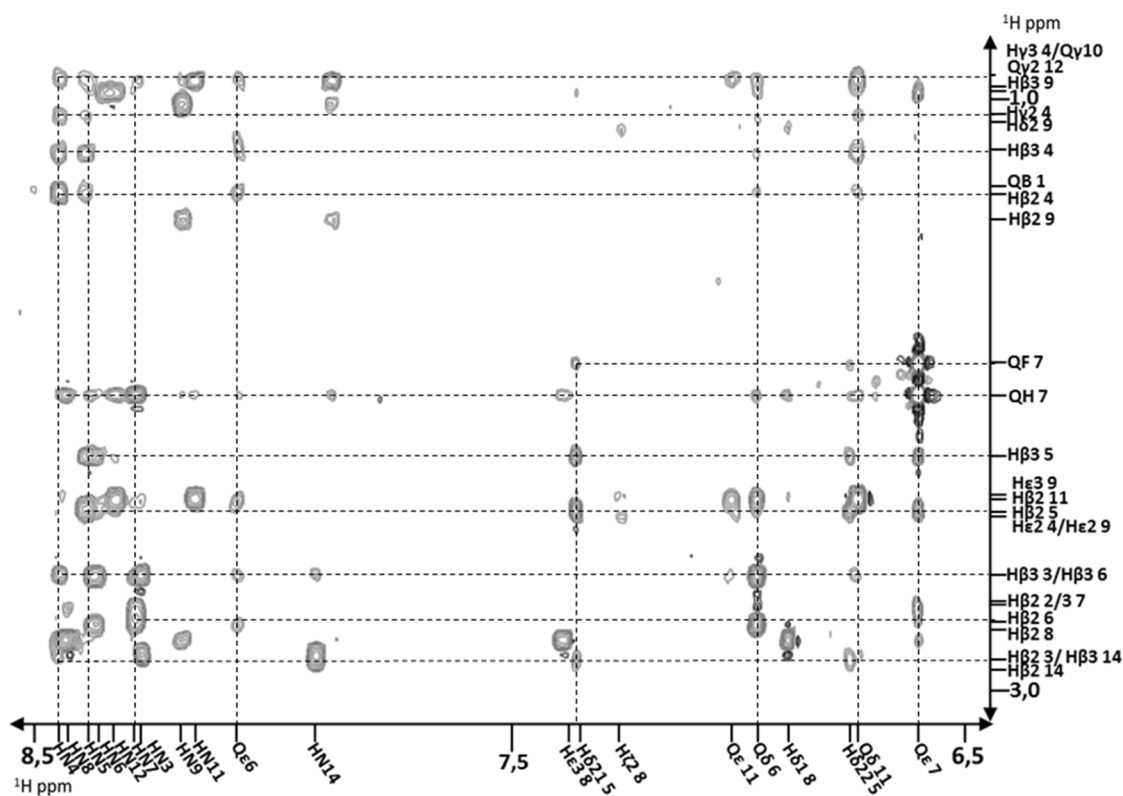


Espectro bidimensional homonuclear NOESY 350 ms para [L-3'Pya7_D-Trp8]-SST (8). Ampliación del cuadrante central izquierda.

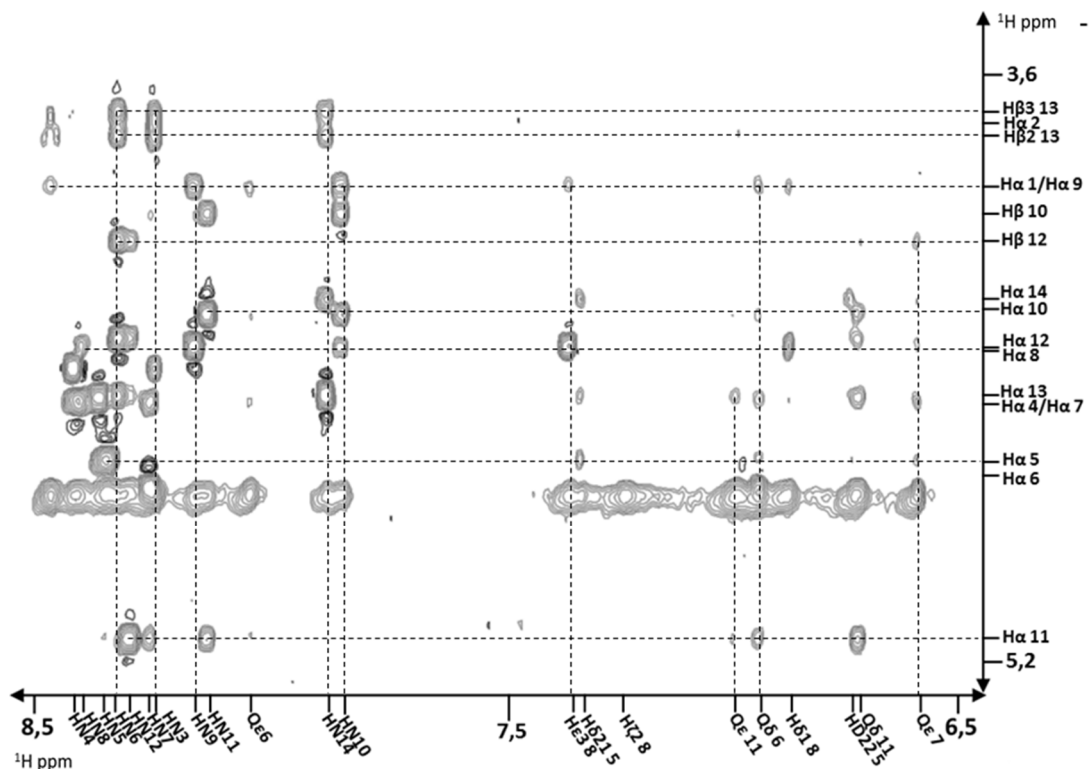


Espectro bidimensional homonuclear NOESY 350 ms para [L-3^{Pya}7_D-Trp8]-SST (8). Ampliación del cuadrante inferior izquierda.

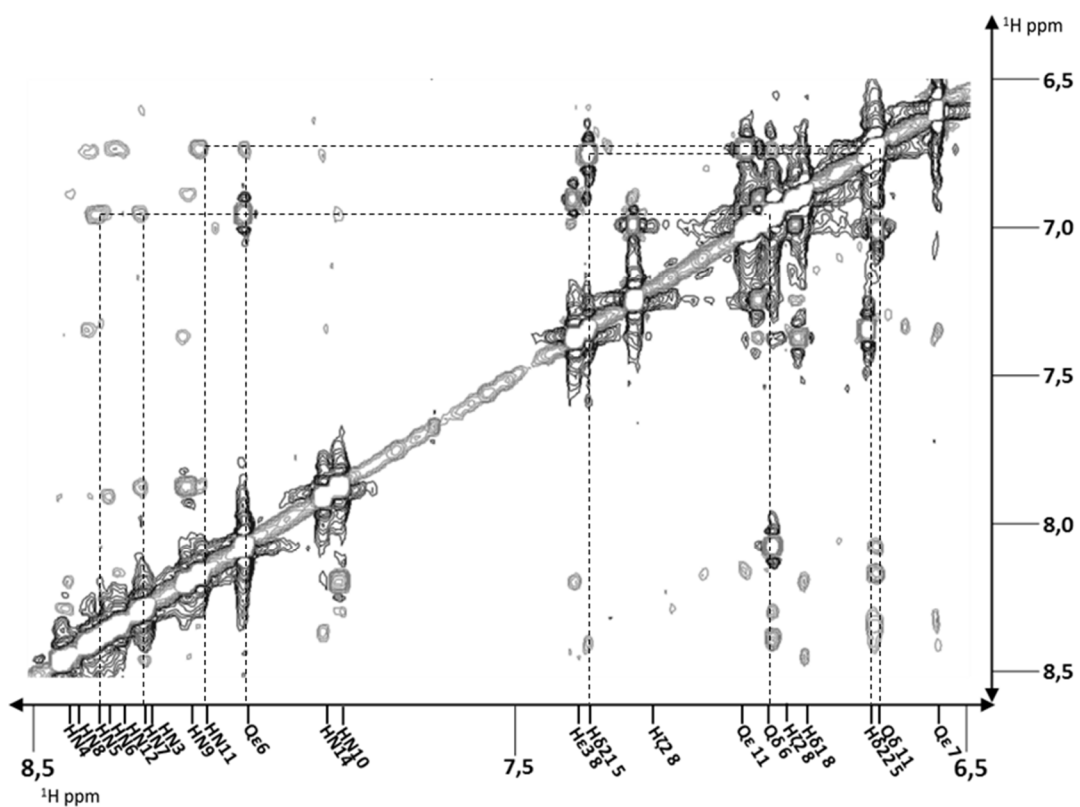
[L-4'Pya6_L-Msa7_D-Trp8]-SST (15)



Espectro bidimensional homonuclear NOESY 350 ms para [L-4'Pya6_L-Msa7_D-Trp8]-SST (15). Ampliación del cuadrante superior izquierda.

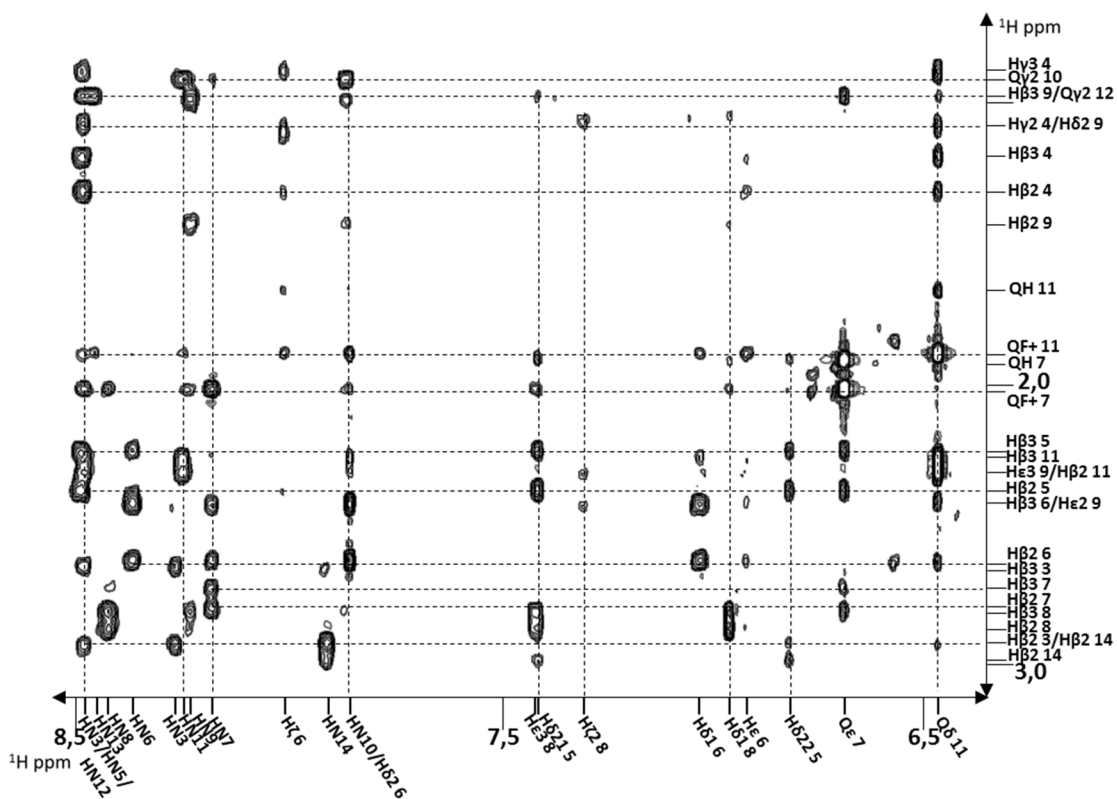


Espectro bidimensional homonuclear NOESY 350 ms para [L-4'Pya6_L-Msa7_D-Trp8]-SST (15). Ampliación del cuadrante medio izquierda.

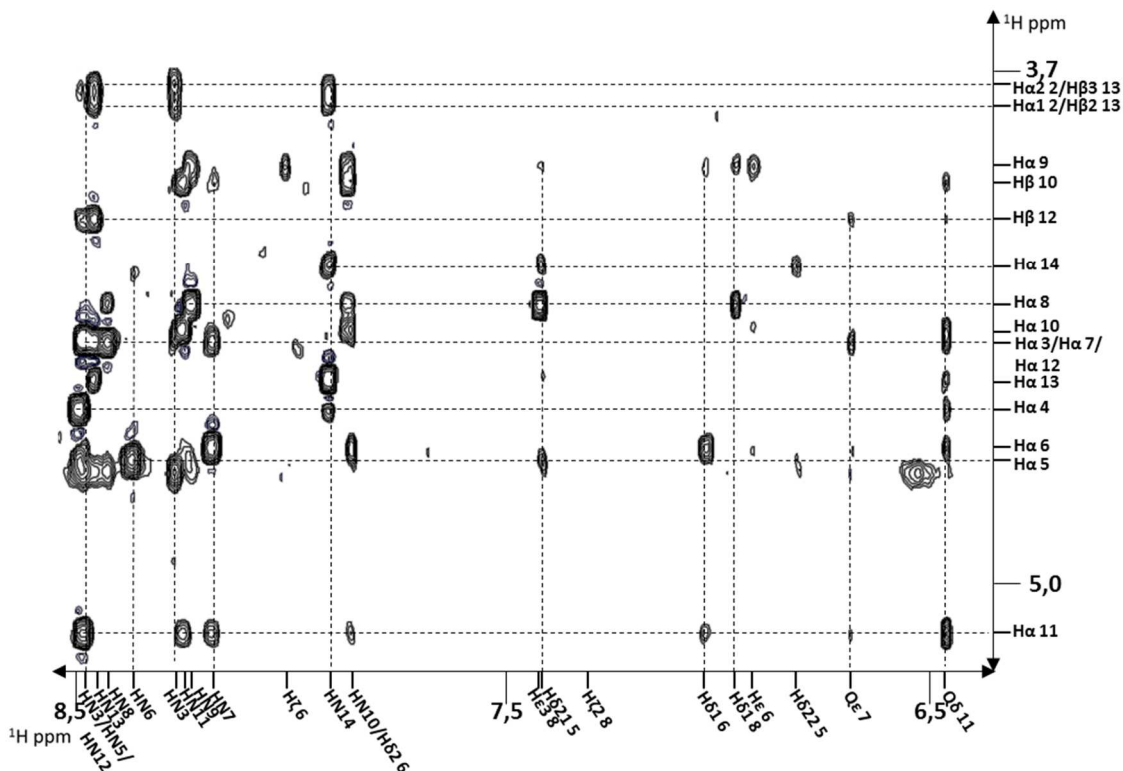


Espectro bidimensional homonuclear NOESY 350 ms para [L-4'Pya6_L-Msa7_D-Trp8]-SST (15). Ampliación del cuadrante inferior izquierda.

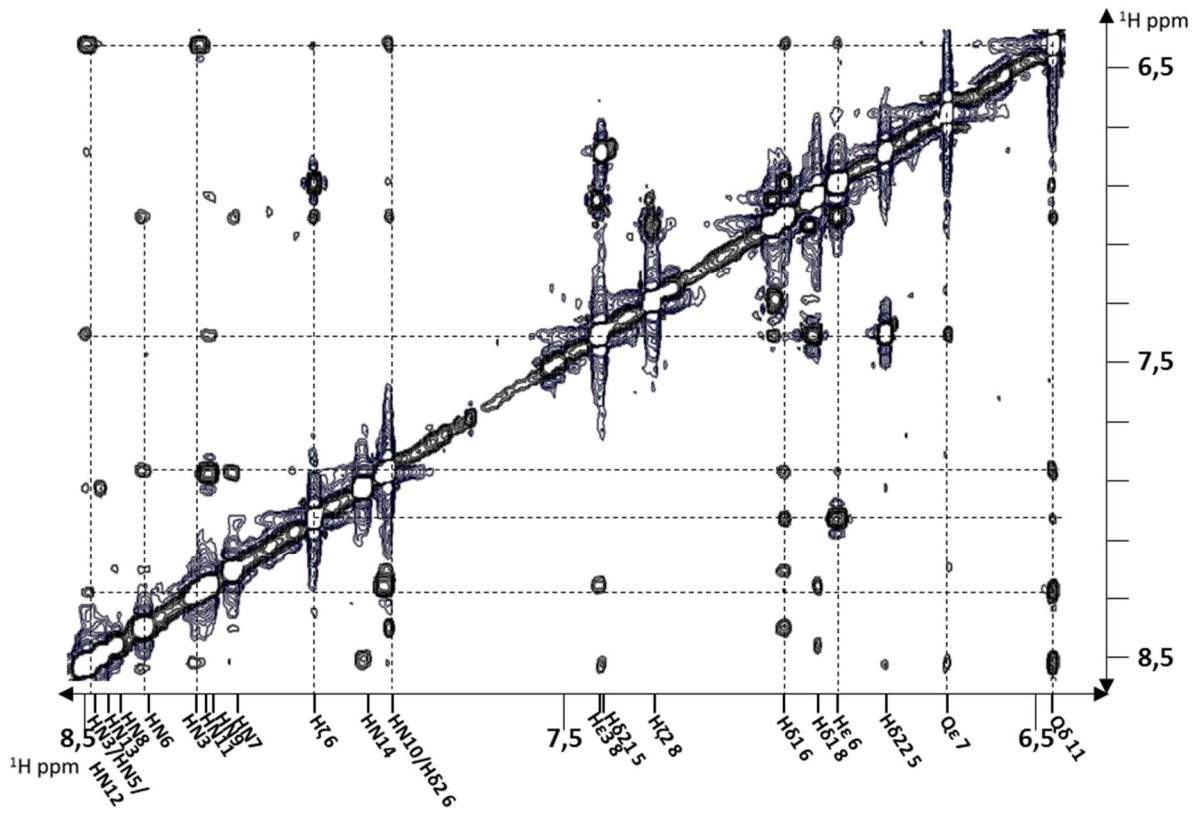
[L-3'Pya6_L-Msa7_D-Trp8_L-Tmp11]-SST (17)



Espectro bidimensional homonuclear NOESY 350 ms para [L-3'Pya6_L-Msa7_D-Trp8_L-Tmp11]-SST (17). Ampliación del cuadrante superior izquierda.

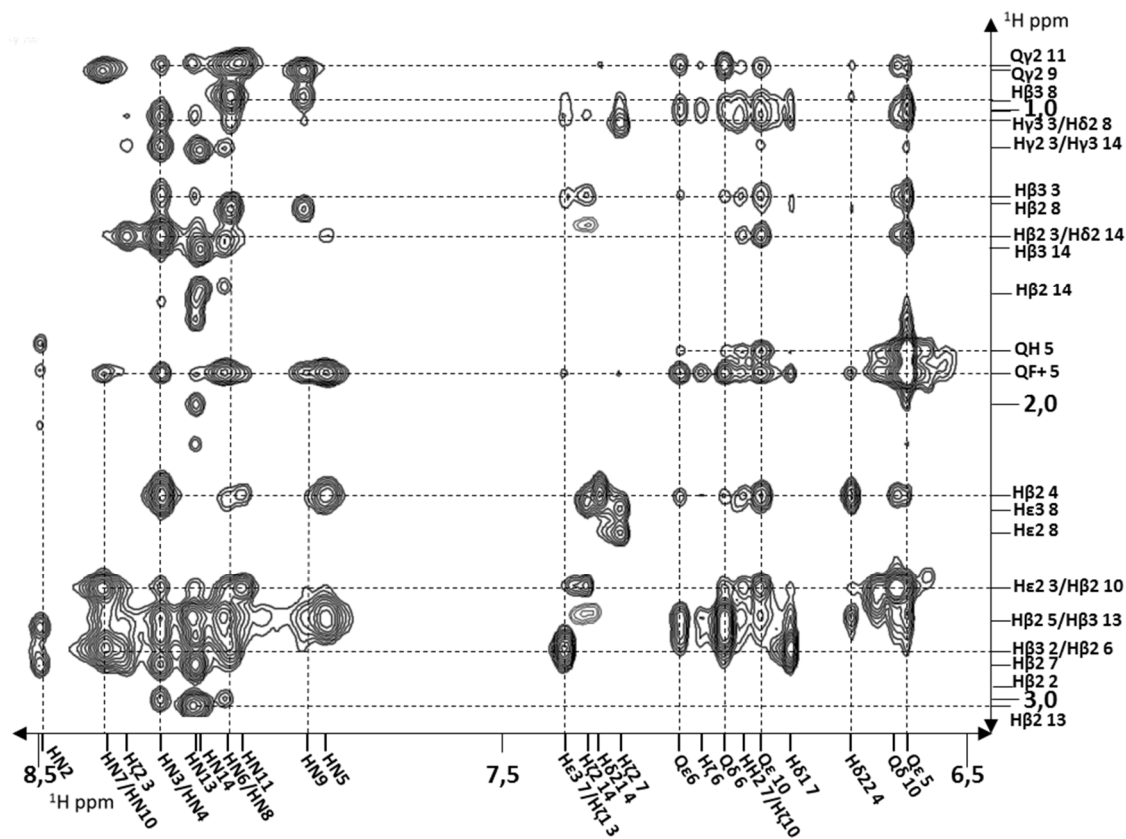


Espectro bidimensional homonuclear NOESY 350 ms para [L-3'Pya6_L-Msa7_D-Trp8_L-Tmp11]-SST (17). Ampliación del cuadrante central izquierda.

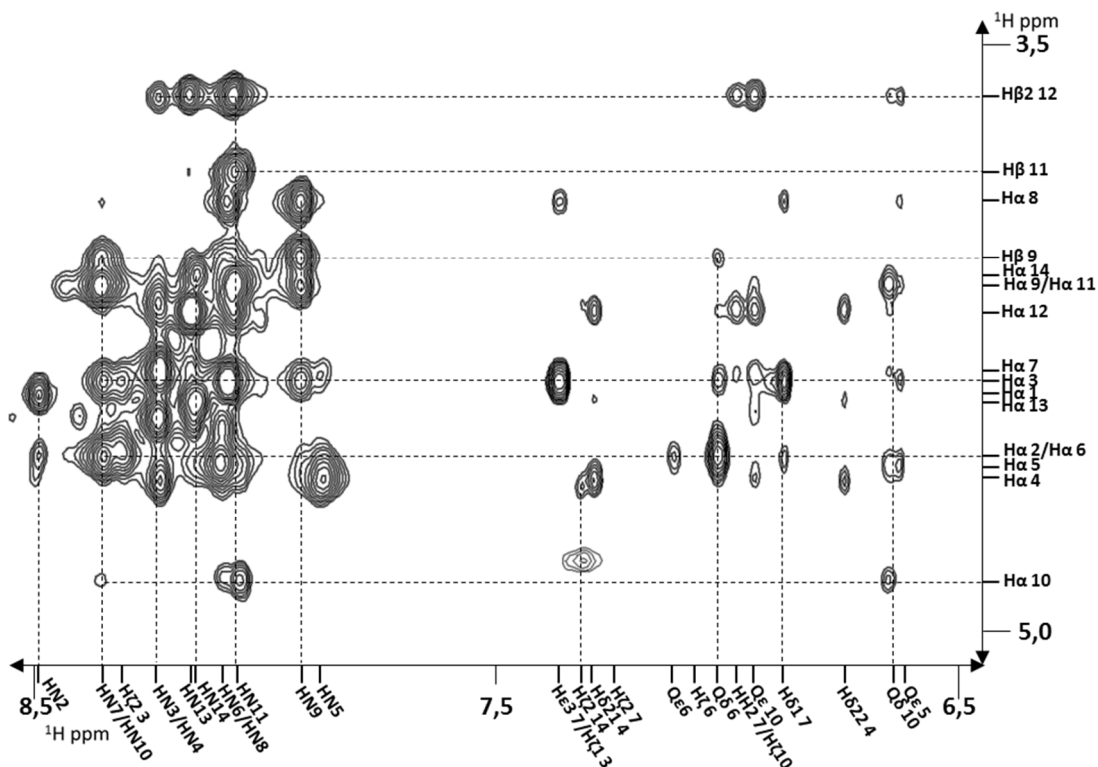


Espectro bidimensional homonuclear NOESY 350 ms para [L-3'Pya6_L-Msa7_D-Trp8_L-Tmp11]-SST (17). Ampliación del cuadrante inferior izquierda.

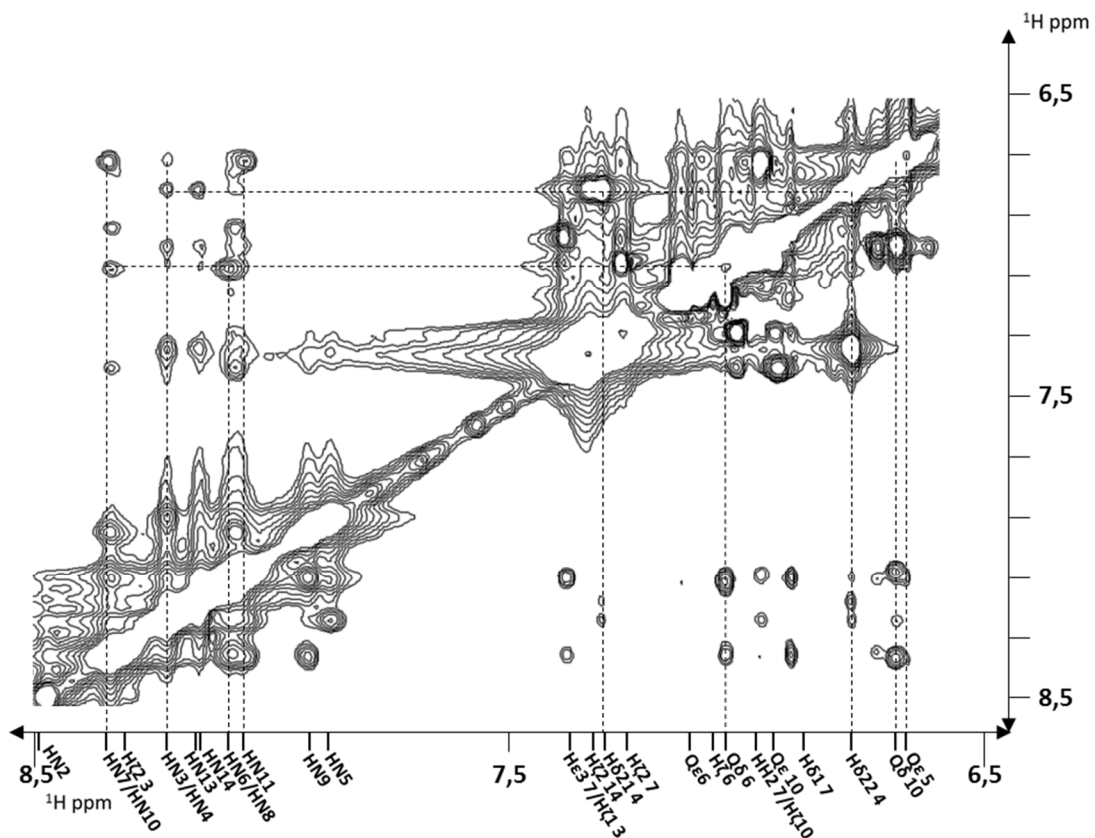
octanoil-[L-Msa5_D-Trp7_L-Thr11]-CST14 (25)



Espectro bidimensional homonuclear NOESY 350 ms para octanoil-[L-Msa5_D-Trp7_L-Thr11]-CST14 (25). Ampliación del cuadrante superior izquierda.



Espectro bidimensional homonuclear NOESY 350 ms para octanoil-[L-Msa5_D-Trp7_L-Thr11]-CST14 (25). Ampliación del cuadrante medio izquierda.



Espectro bidimensional homonuclear NOESY 350 ms para octanoil-[L-Msa5_D-Trp7_L-Thr11]-CST14 (25). Ampliación del cuadrante inferior izquierda.

